
LONDON SCHOOL OF HYGIENE & TROPICAL MEDICINE
LIBRARY

IMMUNITEIT EN COMPLEMENTBINDING BIJ VACCINE

PROEFSCHRIFT

DOOR

R. P. VAN DE KASTEELE



LEIDEN — S. C. VAN DOESBURGH — 1915

IMMUNITEIT EN COMPLEMENTBINDING BIJ VACCINE

IMMUNITEIT EN COMPLEMENTBINDING BIJ VACCINE

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. W. BREDE KRISTENSEN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, VOOR DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 1 DECEMBER 1915, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR REINIER PIETER VAN DE KASTEELE, GEBOREN TE HOORN



LEIDEN — S. C. VAN DOESBURGH — 1915

AAN MIJNE VROUW

EN

AAN MIJNE OUDERS

Nu ik de Leidsche Universiteit ga verlaten, past het mij een woord van dank te richten tot U, Hoogleeraren en oud-Hoogleeraren der Medische en Philosophische faculteit, voor het van U genoten onderwijs.

In de eerste plaats wil ik U, hooggeleerde DE JONG, hooggeachte Promotor, verzekeren dat ik het als een groot voorrecht heb beschouwd onder uwe leiding dit Proefschrift te mogen bewerken. Het is mij eene behoefte U mijne erkentelijkheid te uiten voor de belangstelling die gij in mijn werk hebt getoond, en voor het vele dat ik op uw Laboratorium onder uwe leiding geleerd heb.

Ook U, hooggeleerde NOLEN, ben ik hartelijken dank verschuldigd voor den tijd dat ik als assistent voor de kindergeneeskunde werkzaam heb mogen zijn.

Ich kann an dieser Stelle nicht unterlassen Ihnen, hochverehrter CZERNY, meinen verbindlichsten Dank aus zu sprechen für die Liebenswürdigkeit, mit der Sie mich in ihrer Kinderklinik empfangen haben. Dasz Sie mich in dem Kreise ihrer Assistenten haben aufnehmen wollen, hat die Zeit in Straszburg i/E. für mich zu einer ganz bedeutungsvollen gemacht. Ich möchte Ihnen die Versicherung geben dasz die Begeisterung, welche von Ihnen ausging, mir stets eine grosze Stütze bleiben wird.

Tegenover U, hooggeachte GORTER, past mij een woord van groote erkentelijkheid. Voor wat gij, als mensch en leermeester, mij voor mijn verder leven hebt medegegeven, kan ik U niet dankbaar genoeg zijn. Van harte hoop ik, dat ik, ook na mijn vertrek uit Leiden, mag rekenen op uwen mij steeds zoo bereidwillig gegeven steun.

INHOUD.

Bladz.

HOOFDSTUK I 1

Inleiding. Opvattingen omtrent vaccine-immuniteit. Gestelde vragen. Voordeelen der complementbindingsreactie. Literatuur.

HOOFDSTUK II. 22

Antilichamen bij met vaccine voorbehandelde dieren. Complementbindende antistoffen in het serum bij vaccine. Tijd van optreden en verdwijnen daarvan. Antistoffen in de huid. Literatuur.

HOOFDSTUK III 61

Het al dan niet circuleeren van het virus der vaccine. Aantoonen van antigeen in de circulatie door middel van de complementbindingsreactie. Het verdwijnen daarvan uit de circulatie. Antigeen in de huid. Antigeen in de organen van kippen. Literatuur.

HOOFDSTUK IV 91

De vaccine-immuniteit als histogene in verband met het resultaat der complementbinding. Literatuur.

HOOFDSTUK V. 111

Het gedrag der complementbindende antistoffen bij de vaccine als uiting eener histogene algemeene immuniteit. Literatuur.

STELLINGEN 125

HOOFDSTUK I.

Het heeft voor vele menschen eene geheimzinnige bekoring zich te wagen op een terrein waar zij weinig vaste steunpunten vinden en waar zij, telkens weer, den vasten grond onder hunne voeten voelen wegzakken. Sommigen worden tot zulk een terrein aangetrokken door hunne neiging tot avontuurlijkheden; zij betreden het terrein zonder vast omlijnd plan; zij dwalen rond, doelloos, de enkele steunpunten nog vaak vermijdend, ze niet willende zien in hunne overmoedigheid.

Anderen daarentegen treden doelbewust naar voren, onderzoeken de steunpunten die binnen hun bereik komen op hunne betrouwbaarheid; wijken niet af van den vooraf nauwkeurig afgebakenden weg en trachten, door scherp te observeeren, nieuwe steunpunten op dat terrein te ontdekken.

Deze groepeering valt ook op wanneer wij nagaan het wetenschappelijke werk van onderzoekers die zich hebben bewogen op een gebied waar nog weinig werkelijke „feiten" als zoodanig mogen worden aangenomen. Naast onderzoekingen, wier uitgangspunt en doel scherp omschreven worden, zien we toch vaak dat onderzoekers hypothese op hypothese stapelen, zonder eenig direkt bewijs; ten slotte vergetend dat ook hun punt van uitgang slechts hypothese was.

Ik weet heel goed dat, wanneer ik ga schrijven over een onderwerp dat verband houdt met de vaccine-immuniteit

ik mij waag op een dergelijk gebied en ik besef volkomen dat daaraan, (zooals trouwens aan zooveel waarvan die geheimzinnige bekoring uitgaat) groote moeilijkheden en gevaren verbonden zijn.

Om nu niet in die moeilijkheden verward te geraken, heb ik gemeend goed te doen de punten, die ik op dit gebied wilde behandelen, scherp in vragen te formuleeren, en mij bij het zoeken naar een antwoord strikt aan die vragen te houden.

Alvorens hiertoe over te gaan wilde ik eerst het een en ander over de vaccine-immuniteit in het algemeen mededeelen; mede, omdat daardoor duidelijk wordt waarom ik mij juist *die* vragen heb gesteld. Met nadruk wil ik erop wijzen dat ik alleen zal behandelen reacties van het organisme, zoo, als die optreden bij op verschillende wijzen met vaccine voorbehandelde konijnen. Ik wil dus het verband dat er bestaat tusschen vaccine- en variola-immuniteit in het midden laten.

Voordat ik kan beginnen het een en ander te vermelden van hetgeen ik in de literatuur over de vaccine-immuniteit beschreven vond, is het noodzakelijk eerst eenige algemeene begrippen in de vaccine-immuniteit en daarbij op den voorgrond tredende begrippen in de immuniteitsleer, nader te omlijnen.

Vaccine-immuniteit in het algemeen.

Waar, in het algemeen gesproken, het wezen der immuniteit op zoo talrijke punten nog totaal in het duister ligt, daar behoeft het geen betoog dat dit bij de vaccine-immuniteit te meer zoo is omdat het virus der vaccine, waarvan we weten dat het de bacteriënfilters passeert, praktisch gesproken nog onbekend is, in ieder geval in vitro niet is te cultiveeren; zoodat er dus, bij het experimenteeren op het gebied der vaccine, steeds moet worden gewerkt met een onbekende.

Wij zien, dat wanneer wij een konijn kutaan, subkutaan, intraveneus of intraperitoneaal met vaccine enten, dit dier na eenigen tijd niet op eene nieuwe huidenting reageert, òf, indien het reageert, anders dan een gezond onvoorbehandeld konijn op een dergelijke enting zou reageeren. Dit laatste vereischt nadere toelichting.

Von Pirquet (1)[1]) vond dat bij menschen eene immuniteit in den zin van onontvankelijkheid alleen in den allereersten tijd na de eerste vaccinatie voorkomt. Bij eene revaccinatie nà dien tijd ziet men wel degelijk eene reactie optreden, welke zich echter onderscheidt van de reactie die na eene eerste vaccinatie optreedt. De oorzaak van dit onderscheid is te zoeken in eene verandering in reactievermogen van het organisme, door v. Pirquet a l l e r g i e genoemd. **Allergie.**

Bij de eerste vaccinatie ziet men, gewoonlijk op den 6den dag, eene differentiatie optreden tusschen het centrale gedeelte van de entplaats (*papil*) en den peripheren, hyperaemischen zoom (*aula*). Ongeveer op den 9en dag ziet men deze aula zich sterk uitbreiden en er ontstaat om het centrale gedeelte eene breede hyperaemische, geïnfiltreerde zône (*areola* of *area*). Op den 11en dag bereikt deze area haar maximum, waarna de involutie van het vaccineproces begint.

Bij eene revaccinatie zag v. Pirquet dat ditzelfde proces in geringer intensiteit kon optreden maar meerder of minder (dit in verband met den tijd tusschen eerste- en her-vaccinatie) onmiddellijk in aansluiting aan de herenting. (zgn. v r o e g-r e a c t i e.) Bij herentingen korten tijd na de eerste enting

---

[1]) L i t e r a t u u r aan het slot van dit Hoofdstuk.

trad de areavorming reeds enkele uren na de enting op, terwijl bij revaeeinaties na langeren interval deze area-vorming op den 2^{den} dag begon om op den 6^{en} tot 8sten dag haar maximum te bereiken.

Vroegreactie ook bij konijnen.

Het verdient vermelding dat ik deze vroegreaetie ook zeer duidelijk bij konijnen zag optreden. Ik was eenige malen in de gelegenheid te zien dat voorbehandelde konijnen die kutaan werden herent, binnen 24 uur na die enting langs de entlijnen eene sterke roodheid en zwelling vertoonden die aan het einde van den 2^{den} dag verdwenen waren. Deze reaetie mag in verband met hare hevigheid en den tijd waarop zij optreedt, niet opgevat worden als eene traumatisehe reaetie maar moet worden opgevat als vroegreactie in den zin van VON PIRQUET.

De vraag rijst nu waaraan dan de huid van het voorbehandelde dier dat vermogen te danken heeft om niet of anders dan een niet voorbehandeld, te reageeren; of, algemeener uitgedrukt, waarop de toestand van immuniteit resp. allergie berust.

Wanneer men de versehillende schrijvers naslaat die meenen op deze vraag een antwoord te kunnen geven, dan blijkt, dat in verband met de vaeeine-immuniteit, begrippen naar voren worden gebraeht, waarvan eene seherpere omlijning zeer gewenscht is.

Gedaehtig aan Goethe's „Mit Worten läszt sieh trefflieh streiten" meende ik in de eerste plaats nader te moeten definieeren wat onder de begrippen „histogene immuniteit", „eellulaire immuniteit" en „huidimmuniteit" mijns inziens dient verstaan te worden om daarna op vasteren bodem de uitspraken van de verschillende sehrijvers te kunnen behandelen.

Dieudonné (2) schrijft over histogene s. lokale immuniteit, die daarop berust, dat het weefsel, hetgeen langen tijd de zetel van infectiekiemen is, door de levensuitingen van de daar een tijdlang vertoefd hebbende bacteriën, eene dusdanige verandering ondergaat dat het voor die bacteriën onontvankelijk en onaangrijpbaar wordt. Of het gaat om eene lokale vorming van antilichamen of om eene „Umstimmung" van de cellen laat Dieudonné in het midden.

Much (3) spreekt niet van histogene immuniteit. Hij stelt de humorale immuniteit naast de cellulaire en spreekt daarnaast nog van cel-immuniteit, welke o. a. zou voorkomen bij pokken en voor een deel ook bij tuberculose.

Hij verdeelt de afweermiddelen van het organisme in:

a. opgeloste stoffen:

1. humorale krachten (waarschijnlijk van vaste cellen afstammend).
2. leucocytaire krachten (stammend van de witte bloedlich.)

b. vaste cellen: door verandering in hun cellichaam of door afgifte van stoffen. Op dit specifiek vermogen der cellen zou dan de cel-immuniteit berusten.

c. leucocyten (phagocytose).

Rosenthal (4) spreekt onder lokale immuniteit, van weefselimmuniteit die hij eensdeels in verband brengt met eenen lokalen aanmaak van antilichamen en daarnaast met den allergischen toestand der cellen, welke laatste de blijvende toestand is. Over histogene immuniteit spreekt Rosenthal niet.

Müller (5) plaatst de humorale naast en tegenover de cellulaire s. histogene immuniteit. Bij deze laatste berust het

wezenlijke, immuniteitgevende moment op „der besondere Beschaffenheit der Zellen und Geweben".

Kolle (6) gebruikt het woord „histogene immuniteit" niet. Wel brengt hij de mogelijkheid van het bestaan eener lokale actieve immuniteit naar voren. Hetzij, dat dan de cellen zijn gekomen in een toestand van veranderde prikkelbaarheid (analoog de hersencellen bij de herinneringsbeelden in het onderbewustzijn); hetzij, dat in de cellen eene opzameling van antistoffen plaats heeft.

Zeer begrijpelijk is het begrip lokale immuniteit s. weefsel-immuniteit s. cel-immuniteit.

Lokale Immuniteit.

Deze toestand van immuniteit berust op eene verandering van het weefsel resp. van de cel waardoor binnendringende ziektekiemen daarin onmiddellijk onwerkzaam worden gemaakt.

Of blijvende antilichamen hierbij een rol spelen worde voorloopig in het midden gelaten.

Cellulaire Immuniteit.

Geheel anders staan wij tegenover de begrippen histogene en cellulaire immuniteit. Het begrip cellulaire immuniteit, zooals dat door Much naar voren wordt gebracht, kan dunkt mij, alleen verwarring stichten, speciaal wanneer dan daarnaast nog van celimmuniteit gesproken wordt.

Immers, wanneer men vasthoudt aan de opvattingen van Ehrlich moet men zich toch iedere actieve immuniseering denken als te zijn ontstaan door cellulaire werking.

Histogene Immuniteit.

Van histogene immuniteit mag men, mijns inziens, alleen dàn spreken, wanneer men vasthoudt aan het genetisch begrip dat in het woord ligt opgesloten. Dit mag dus nooit gezegd worden van eenen blijvenden toestand maar geldt alleen voor het ontstaan van de immuniteit. Het begrip „histogene immuniteit" brengt dus, uitgaande van de Ehr-

LICH'sche opvatting dat diè cellen tot receptorenaanmaak geprikkeld worden die voor het antigeen haptophore celdeelen bezitten, alleen in zooverre iets nieuws dat er bij speciale infecties speciale weefsels eene groote aviditeit voor die infectieverwekkers zouden bezitten en dat het ontstaan van de immuniteit (m. a. w. de aanmaak der antilichamen) speciaal van diè weefsels zou uitgaan.

Verschillende mogelijkheden bij de vaccine-immuniteit.

Wanneer ik nu deze begrippen op de vaccine-immuniteit toepas, zou ik de verschillende mogelijkheden aldus willen formuleeren:

a. Wanneer men aanneemt dat bij de vaccine het virus in de circulatie komt en op verschillende onbekende plaatsen antistoffen vormt, die in de circulatie verschijnen, dan zou ik willen spreken van algemeene immuniteit.

b. Wanneer men aanneemt dat het virus slechts betrekkelijk korten tijd circuleert, onmiddellijk naar de huid gaat en daar antilichamen produceert, spreek ik van histogene immuniteit.

c. Neemt men bij deze veronderstelling bovendien nog aan dat de huid door dat immuniseeringsproces veranderd wordt en in staat is, direkt of indirekt binnendringend virus ter plaatse te vernietigen, dan spreek ik van histogene huidimmuniteit.

d. Veronderstelt men echter dat het opnieuw binnengedrongen virus ook nog elders dan in de huid wordt onwerkzaam gemaakt door middel van door de huid afgescheiden antilichamen dan zou ik willen spreken van eene histogene algemeene immuniteit.

Na deze uiteenzetting wil ik dan de verschillende, door

mij in de literatuur gevonden meeningen nader bespreken en, hoezeer deze meeningen ook uiteen loopen, toch blijkt dat zij ten slotte zijn onder te brengen in twee hoofdgroepen die ik kortweg zou kunnen omschrijven als:

Groep I die de vaccine-immuniteit opvat als eene algemeene immuniteit.

Groep II die de oorzaak der immuniteit zoekt in processen en veranderingen die zich uitsluitend in de huid afspelen.

Algemeene immuniteit.

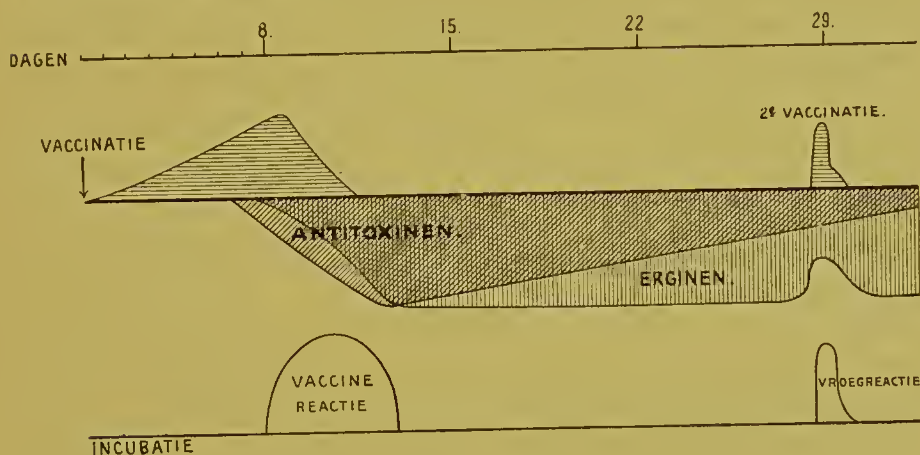
Tot de eerste groep reken ik de meeningen van hen die eene speciaal groote beteekenis toekennen aan het voorkomen van antilichamen in het serum. Naast de opvattingen van BÉCLÈRE, CHAMBON en MÉNARD (7 en 8) die studies maakten over het virulicide vermogen van het serum van geënte kalveren, en pogingen deden tot passieve immuniseering tegen variola met serum van met vaccine voorbehandelde dieren (zie ook Hoofdstuk II) moet dan speciaal de meening van VON PIRQUET nader worden besproken.

VON PIRQUET (1) meent dat het virus, van af de entplaats waar het zich vermenigvuldigt, in dooden of levenden toestand in de circulatie komt en gebracht wordt naar de inwendige organen die antilichamen produceeren; en dat deze antilichamen dan vanuit beenmerg, milt, lymphklieren enz. in den bloedbaan komen. Hieruit verdwijnen zij na eenigen tijd, maar blijven nog langen tijd in de weefsels van het organisme voortbestaan. Ten slotte verdwijnen zij ook hier en blijft slechts het vermogen van het organisme nieuwe antilichamen veel sneller te vormen dan bij de eerste infectie.

VON PIRQUET bespreekt verder hoe hij zich het wezen der zgn. vroegreactie (zie boven) voorstelt. Om dit ver-

schijnsel te verklaren neemt hij twee verschillende soorten antilichamen aan: antitoxische en lytische, die min of meer onafhankelijk van elkaar optreden. Wanneer er geen reactie komt zouden beide soorten antilichamen onmiddellijk ter plaatse zijn; terwijl bij de zgn. vroegreactie de lytische overheerschen en de antitoxische pas later in werking treden. VON PIRQUET beschouwt de vroegreactie dus niet als eene zuiver plaatselijke, maar veeleer als eene algemeene reactie.

GASTINEL (9), die op grond van serumreacties bij de vaccine (zie ook Hoofdstuk II) tot eene dergelijke opvatting komt, stelt de geeombineerde werking der twee soorten antistoffen aldus voor.



Verklaring van de figuur:
Op eene eerste enting zien we het organisme dus na eene incubatie van ongeveer 7 à 8 dg. reageeren met den aanmaak van antilichamen. Het eerst treden de antitoxinen (v. Pirquet) s. complementbindende antistoffen (Gastinel) op, kort daarna de viriilicide stoffen (lysinen van Pirquet, erginen van Gastinel). Hebben beide soorten hun maximum bereikt dan eindigt de vaccinereactie van het organisme. Van af dat moment vermindert de hoeveelheid antitoxinen betrekkelijk zeer snel, terwijl de erginen aanwezig blijven. Herent men nu b.v. den 28sten dag dan ziet men onmiddellijk reactie, op een moment dat de erginen (s. lysinen) overheerschen. Deze breken het virus af, zoodat toxinen vrijkomen die niet onmiddellijk door antitoxinen kunnen worden geneutraliseerd en de vroegreactie opwekken.

CAMUS (10) brengt de vaccinale immuniteit van de huid op rekening van het gehalte van het serum aan virulicide stoffen.

In de literatuur der latere jaren is het voornamelijk CASAGRANDI (11) die het algemeen karakter der vaccine-immuniteit verdedigt.

Volgens CASAGRANDI gaan de immuniseeringsverschijnselen die zich in het organisme afspelen steeds gepaard met de vorming van circuleerende antistoffen, die door middel van de methode van BORDET en GENGOU (complementbindingsreactie) zijn aan te toonen. Toch mag men uit het optreden van deze antilichamen niet opmaken eene immuniseering van alle weefsels, daar b.v. bij eene toediening van het vaccinevirus per os wèl antilichamen verschijnen maar de slijmvliezen niet immuun blijken.

CASAGRANDI vond 10 dagen na kutaanenting met vaccinefiltraat het virus in de milt en de nieren (Enting met het extract dezer organen geeft vaccinepuisten bij den hond en Guarnieri'sche lichaampjes in het corneaepitheel).

Het optreden van het virus in de nier alleen scheen niet met het optreden van antilichamen in de circulatie samen te vallen; deze waren alleen dàn aan te toonen, wanneer het virus in de milt aanwezig was. Dit schijnt er op te wijzen, schrijft CASAGRANDI, dat de algemeene immuniteit niet alleen gebonden is aan de immuniteit van het weefsel waarin het virus is geënt en waarin de vaccinale laesie verwekt wordt, maar ook, aan de immuniteit van speciale inwendige organen.

Huidimmuniteit. Daarnaast en daartegenover staan dan de opvattingen dat de vaccine-immuniteit eene zuivere huidimmuniteit is.

Reeds L. PFEIFFER (12) zoekt het zwaartepunt voor de

vaccine-immuniteit in de epitheelcel. Hij meent dat het voortbestaan der immuniteit afhankelijk is van een in „sporontenform" in de huid blijven voortleven van het virus.

VON PROWAZEK en YAMAMOTO (13) komen op grond van hunne onderzoekingen waarmede zij aantoonen dat het virus na intraveneuze injectie slechts 1 uur in de circulatie blijft maar na 2 dagen nog in de huid te vinden is tot de conclusie dat de vaccine-immuniteit eene „zuivere histogene huidimmunitcit" is; zonder zich verder over het wezen daarvan uit te laten, zoodat niet duidelijk wordt of de schrijvers zich de tweeledigheid van dit begrip bewust zijn.

In zijn handboek zegt VON PROWAZEK (14) onder het hoofdstuk Vaccine: „Die Impfung setzt in erster Linie eine Hautimmunität; vom Hautorgan aus erscheinen unregelmäszig nach einiger Zeit und für einen nicht all zu langen Zeitraum Antikörper im Blutstrom, was bei einer cornealen Immunisation gar nicht der Fall ist. Die Immunität der Vaccine-Variola ist in erster Linie eine celluläre". Dat dit woord „celluläre" hier niet duidelijk te begrijpen is, behoeft na het boven over dit begrip gezegde, geen nadere verklaring.

SÜPFLE (15) komt in verband met zijne onderzoekingen die zouden aantoonen dat het kutaan en subkutaan ingebrachte vaccinevirus niet in de circulatie komt tot de volgende conclusies:

1. Lokale Insertion des Vaccine-erregers hat nur eine lokale Manifestation und Reproduktion des Erregers zur Folge.
2. Von der Haftstelle aus bewirkt der Vaccineerreger die Entstehung der Immunität.
3. Diese Immunität is eine histogene und erstreckt sich auf diejenigen Epithellagen, welche mit der Stelle der Pustel-

bildung eine ernährungsphysiologische Einheit bilden.

Dat deze conclusies van SÜPFLE een nader licht werpen op het wezen van eene dergelijke immuniteit, zou ik niet willen zeggen. Immers wordt het ons niet duidelijk gemaakt hòe SÜPFLE zich voorstelt, dat vanuit de entplaats de vaccineverwekker het ontstaan der immuniteit van de epitheellagen bewerkt.

Onmogelijk kunnen we ons voorstellen, dat op de entplaats een soort actieve immuniteit optreedt die zich als het ware per continuitatem aan alle andere epitheelcellen mededeelt. Eene andere mogelijkheid ware, dat ter plaatse van de enting immuunstoffen zouden worden gevormd; dat deze via de bloedbaan naar de huid werden gebracht en aan deze werden afgegeven, hoewel wij dan zouden moeten aannemen dat die antilichamen zonder actief gebeuren in de epitheelcellen daaraan werden vastgelegd, of anders uitgedrukt, dat afgestooten vrije receptoren konden veranderen in vast aan de cel verbonden receptoren.

Eene derde mogelijkheid brengt HALLWACHS (16) naar voren. Op de vraag welke mogelijkheid er bestaat om de huidimmuniteit te verklaren antwoordt hij: „Von der Impfstelle aus gelangt das Virus abgetötet oder schon abgebaut bis auf seine als Antigen noch wirksamen Bestandteile auf dem Blutwege zu jeder ihm spezifisch verwandten Deckepithelzelle, wird electiv von ihr angezogen, reagiert mit ihr in der Weise, das es sie verändert „allergisch" macht, ihr „histogene Immunität" verleiht, sie nach Verankerung an präformierte Rezeptoren befähigt, diese Rezeptoren im Ueberschusz zu bilden und auch ab zu stoszen. Die von den Deckepithelzellen abgestoszenen Rezeptoren fluten nun zurück ins Blut und durch den ganzen Körper, sind im

Serum eine Zeitlang nachweisbar und geben durch Antigen-Antikörperreaktion mit Anlasz zur Bildung der Areola."

En ten slotte zegt HALLWACHS onder het tweede punt zijner samenvatting:

„Die Hautimmunität ist im Wesentlichen weder durch die Bordet'schen noch durch die antivirulenten Körper des Serums bedingt. Sie ist viel mehr nach dem Vorgang von Prowazeks als histogene auf zu fassen, aber in dem Sinne, dasz die Gesamthautdecke eine aktive Immunisierung durchmacht."

JOCHMANN (17) zegt: „Der Gehalt des Serums an viruliciden Stoffen ist aber für das Zustande kommen der Variola immunität vermutlich nur von untergeordneter Bedeutung." En wat verder bij de bespreking dat het eigenlijke begin der huid-immuniteit onafhankelijk zou zijn van het optreden der antilichamen in het serum en dat de immuniteit nog blijft bestaan al zijn de antilichamen uit het serum verdwenen: „Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dasz sich die Immunitätsvorgänge nicht im Serum sondern im Hautorgan abspielen, dasz also eine vom Hautgewebe ausgehende histogene Immunität die Hauptrolle spielt. En bij de bespreking hoe men zich de functie en het voortduren der huidimmuniteit moet voorstellen: „In der verschärften Bereitschaft der Hautzellen zur Abwehr des eingedrungenen Feindes besteht die Vaccine-variola-immunität."

HALBERSTÄDTER en VON PROWAZEK (18) komen op grond van het feit dat zij bij apen bij kutaanenting in het algemeen een overgaan van het virus in de bloedbaan niet konden aantoonen tot de conclusie: „dasz die Vaccine vorwiegend eine epitheliale Erkrankung (Epitheliose) ist und dasz bei ihr das Virus im allgemeinen nicht in den Blutkreislauf

übertritt. Es tritt demnach bei der Vaccine im allgemeinen eine ektodermale, histogene Immunität auf, die vorwiegend auf die Gewebe gebunden ist, während im Serum nur spärliche viruliciде Antikörper in variablen Mengen auftreten."

Tomarkin en Carrière (19) schrijven in het handboek van Kolle en Wassermann: „Jedenfalls aber bleibt die Tatsache unbestritten dasz beide Virusarten (variola en vaccine) die ausgesprochene Tendenz besitzen, ungeachtet der Einführungswege schlieszlich im Hautorgan sich anzusiedeln, um dort weiter zu leben und ihren Entwicklungsgang durch zu machen. Hier rufen sie nün jene Vorgänge hervor deren auffälligste Manifestation die Immunisierung des Hautorgans ist und diese Erscheinung im Zusammenhang mit ihrer biologischen Kennzeichnung als Virusarten von rein epidermalem Charakter läszt die Vermutung als berechtigt erscheinen, dasz die Variola-vaccineimmunität eine histogene, lediglich an die Tätigkeit der Zellen des Hautorgans gebundene sein musz."

Ten slotte dient in dit verband Paschen (20) genoemd ofschoon hij zich niet beslist voor de eene of andere opvatting uitspreekt. Voornamelijk wijst hij op het feit dat de leucocyten eene rol bij de immuniseering moeten spelen. Op de onderzoekingen van Paschen in verband met de eigenaardige rol die de cornea speelt bij de kutane immunisatie kom ik in Hoofdstuk V nader terug.

De argumenten aangevoerd voor de, als vermoedens en hypothesen, door de verschillende schrijvers geuite meening dat de huid de voornaamste rol bij de vaccine-immuniteit moet worden toegekend, zijn dus in het kort de volgenden (21):

1. Door de meeste onderzoekers kon het vaccinevirus niet of slechts zeer kort in de bloedbaan worden aangetoond terwijl ook in de inwendige organen door de meerderheid geen virus werd aangetroffen.

Aangevoerde argumenten voor de huidimmuniteit.

2. De toestand van immuniteit resp. allergie duurt veel langer dan dat virulicide en complementbindende stoffen in het serum konden worden aangetoond.
3. De huidimmuniteit blijkt reeds aanwezig vóór de antilichamen in het serum zijn (HENSEVAL en CONVENT (22) o. a. vonden reeds den 4en dag na de enting huidimmuniteit terwijl eerst den 7en tot 10en dag de antilichamen verschenen).
4. De door de meerderheid aangenomen lokale corneaimmuniteit. (Zie Hoofdstuk V).

Om nu te trachten eigen inzicht in deze vraagstukken te krijgen heb ik mij de volgende vragen ter beantwoording voorgelegd:

Te beantwoorden vragen.

Vraag 1. Zijn in het serum, of eventueel ook in inwendige organen en huid van met vaccine voorbehandelde konijnen antilichamen tegenover de vaccine aan te toonen? En zoo ja: is de aanwezigheid van deze antilichamen aan een gegeven tijd gebonden? (Hoofdstuk II.)

Vraag 2. Is de vaccine of een als antigeen werkzaam deel daarvan in de circulatie of eventueel ook in de inwendige organen en de huid aan te toonen? En zoo ja: is de aanwezigheid van het antigeen daarin aan een gegeven tijd gebonden? (Hoofdstuk III).

Methode der complementbindingsreactie.

Ik heb getracht deze vragen te beantwoorden volgens de methode der complementbindingsreactie; dus eensdeels getracht met vaccineantigeen complementbindende antilichamen in serum en orgaanextracten aan te toonen;

andersdeels met behulp van een sterk immuunserum naar antigeen in serum, bloed, en orgaanextraeten gezoeht.

Voor de beantwoording van vraag 2 lag de methode der eomplementbinding voor de hand. Immers, wanneer men zich afvraagt waarom door de versehillende onderzoekers steeds weer naar een mogelijk aanwezig virus in de eirculatie en de organen is gezocht, dan moet, in verband met het immuniteitsvraagstuk, toeh wel de reden hiervoor mede gevonden worden in het feit dat gezocht werd naar een antwoord op de vraag wàar de vaceinale antistoffen gevormd worden. En dan dient opgemerkt dat voor het doen ontstaan van antiliehamen in het organisme toeh een levend virus (aantoonbaar door dierexperiment en corneaproef) geen vereisehte is. Om als antigeen te werken behoeft de vaeeine niet virulent voor proefdieren, niet levend, te zijn.

Ook bij de vaeeine is aangetoond o. a. door KRAUS en VOLK (23) en SÜPFLE (24) en KNOEPFELMACHER (25) dat het mogelijk is eene partieele en soms totale immuniteit te krijgen door injeetie van door verhitting gedoode vaecine zonder dat hier dus eenige manifestatie van het virus mogelijk is.

Ik heb gemeend dat het negatief uitvallen van entingsproeven [1]) nog niet bewijst dat er geen antigeen in het entmateriaal aanwezig is en hoopte dus dat de methode der complementbindingsreactie hier nader licht zou kunnen verschaffen.

Een eerste vereisehte hiervoor was de betrouwbaarheid

---

[1]) Over de gevoeligheid en betrouwbaarheid dezer entingsproeven: zie Hoofdstuk III.

der door BORDET en GENGOU (26) aangegeven methode voor het aantoonen van antilichamen bij de vaccine na te gaan, en te zien, of het mogelijk was een dusdanig sterk immuunserum te krijgen dat het met eene sterke verdunning van het antigeen nog eene duidelijke reactie opleverde. Deze quaestie sluit zich aan bij de beantwoording van Vraag I.

Gevoeligheid en betrouwbaarheid der complementbindingsreactie.

Ten slotte nog een enkel woord over de gevoeligheid en betrouwbaarheid der complementbindingsreactie, zooals deze, voor het aantoonen van antigeen, door NEISSER en SACHS (27) is aangegeven. De specificiteit van deze reactie toonden NEISSER en SACHS aan door het feit, dat antisera die met homoloog serum nog in eene hoeveelheid van 0,00001 cM³. eene reactie gaven, zelfs met eene hoeveelheid van 0,01 cM³. van een heteroloog serum geen complement bonden.

UHLENHUTH (28) zegt in verband met de waarde dezer reactie voor de biologische eiwitdifferentieering: „die wissenschaftlichen Grundlagen dieser Methode sind absolut sichere, und es kann auf Grund theoretischer Erwägungen an der Zuverlässigkeit der Methode nicht gezweifelt werden."

En het is juist de groote gevoeligheid dezer reactie die eenen strijd heeft doen ontstaan over de vraag of zij mocht gebruikt worden voor eiwitdifferentieering voor forensische doeleinden. Eerst FRIEDBERGER (29), en later ook UHLENHUTH (30) toonden n.l. aan, dat een sterk antiserum bij de complementbinding evengoed met andere homologe, eiwithoudende weefsels en sappen reageeren kan als met bloed. Zoo bezat FRIEDBERGER een bijzonder sterk werkzaam antiserum dat ook met menschelijk zweet in zeer groote verdunning nog complementbinding gaf.

De groote gevoeligheid der complementbindingsreactie blijkt ook nog uit de onderzoekingen van GAY en RUSK (31). Zij vonden o. a. dat, wanneer men konijnen die tegen paardenserum geïmmuniseerd waren 1. c. c. paardenbloed intraveneus injiceerde, dit, antigeen bevattende, immuunserum nog 24 uur en langer na de injectie eene positieve complementbindingsreactie met een ander immuunserum vertoonde, m. a. w. dat het antigeen (paardenserum) door middel dezer reactie nog minstens 24 uur in de circulatie van het geïmmuniseerde dier aan te toonen was.

Op grond van het boven uiteengezette hoopte ik dat de complementbindingsmethode mij een antwoord zou geven op de gestelde vragen en tevens hoopte ik, (al weten wij, dat ook bij de vaccine de immuniteit geenszins parallel gaat met de aanwezigheid van complementbindende antistoffen in het serum) door middel van deze methode eenig nader inzicht te krijgen in de rol die de huid in het immuniteitsvraagstuk bij de vaccine zou kunnen spelen.

LITERATUUR.

1. Von Pirquot. Klinischo Studien über Vakzination und vakzinale Allergie. 1907.

2. Dieudonné. Immunität, Schutzimpfung und Scrumtherapie. 1909.

3. Much. Die Immunitätswissenschaft. 1914

4. Rosenthal. Tierische Immunität. 1914.

5. Müller. Vorlesungen über Infektion und Immunität. 1912.

6. Kolle. Die Grundlagen der Lehre von der erworbcnen (aktiven, allgemeinen und lokalen, sowie passiven) Immunität. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Herausgegcben von Kolle und v. Wassermann. Bd 1. 1913.

7. Béclère, Chambon et Ménard. Etudes sur l'immunité vaccinale et le pouvoir immunisant du serum de génisse vaccinée. Annales de l'Inst. Pasteur. Tome 10. 1896.

8. —— Etudes sur l'immunité vaccinale 2e et 3e Mémoire. Annal. de l'Inst. Pasteur. Tomes 12 et 13. 1898 et 1899.

9. P. Gastinel. Des réactions d'infection et d'immunité dans la vaccine et la variole. Thèse de Paris 1913.

10. L. Camus. Recherches sur l'immunité vaccinale passive et sur la sérotherapie. Journal de physiol. et de path. générale. 1912.

11. Casagrandi. Su alcuni questioni relative al immunità antivaccinale ottenuta col vaccino filtrato attraverso le Berkefeld W. Annale d'Igiene sperim. vol. 19. 1909. (Ref. Zeitschr. f. Imm. forsch. 1909. Ref.)

12. L. Pfeiffer. Die modernen Immunitätslehren und die Vaccination. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. Krankh. Bd 43. 1903.

13. v. Prowazek und Yamamoto. Experimentelle und morphologische Studien über das Vaccinevirus. Münchn. med. Wochenschr. nº. 51. 1909.

14. von Prowazek. Handbuch der pathogenen Protozoen. Bd 1. 1912.

15. Süpfle. Die Vaccineimmunität. Archiv. f. Hyg. Bd 68. 1908.

16. Hallwachs. Ueber Komplementbindungsversuche mit dem Serum lapinisierter Kaninchen. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 69. 1911.

17. Jochmann. Pocken und Vaccinationslehre. Nothnagel's Handbuch. 1913.

18. Halberstädter und v. Prowazek. Experimentelle Untersuchungen über die Vaccine der Affen. Arb. a. d. kaiserl. Gesundheits-Amte. Bd 37. 1911.

19. Tomarkin und Carrière. Variola und Vaccine. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Herausgegeben von Kolle und v. Wassermann. Bd 8. 1913.

20. Paschen. Ueber Immunitätsverhältnisse bei Variolavaccine. Handbuch v. Kraus und Levaditi. Erster Ergänzungsband. 1911.

21. Süpfle. Das Wesen des Impfschutzes im Lichte der neueren Forschungen. Ergebnisse der Immunitätsforschung etc. herausgegeben von Weichhardt. Bd 1. 1914.

22. Henseval et Convent. Recherches sur l'immunité vaccinale. Revue internat. de la Vaccine. Tome 3. 1912—1913.

23. Kraus und Volk. Weitere Studien über Immunität bei Syphilis und bei der Vaccination gegen Variola. Wiener klin. Woch.-schr. 1906.

24. Süpfle. Leitfaden der Vaccinationslehre. 1910.

25. Knoepfelmacher. Aktive Immunisierung des Menschen mittels abgetöteter Pockenvaccine. Med. Klinik. 1910.

26. Bordet et Gengou. Sur l'existance de substances sensibilatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. Annal. de l'Inst. Pasteur. 1901.

27. Neisser und Sachs. Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berl. klin. Woch.schr. n⁰. 44. 1905.

28. Uhlenhuth. Geciteerd naar Sachs und Altmann. Komplementbindung. Handb. der pathog. Mikroorganismen. Herausgegeben v. Kolle und v. Wassermann. Zweiter Ergänzungsband. 1909.

29. Friedberger. Zur forensischen Eiweiszdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung, nebst Bemerkungen über die Bedeutung des Präzipitates für dieses Phänomen. Deutsche mediz. Woch.schr. n⁰. 15. 1906.

30. Uhlenhuth. Komplementablenkung und Bluteiweiszdifferenzierung. Deutsche med. Woch.schr. nos. 31 und 51. 1906.

31. Gay and Rusk. Studies on the origin of antibodies I. The persistance of a soluble antigen in the serum of immunized rabbits. University of California publications in pathology. Vol. 2. nos. 6 and 7. 1912.

HOOFDSTUK II.

Vaccine-antilichamen. Reeds vele onderzoekers hebben getracht antwoord te geven op de vraag of er in het serum van met vaccine voorbehandelde dieren en menschen immuunstoffen tegen den vaccineverwekker zijn aan te toonen.

Praecipitinen. In de eerste plaats is door middel van de praecipitatie-reactie gezocht naar praecipitinen. Een groot bezwaar voor deze reactie is dat wanneer men lymphe en serum bij elkaar brengt er een bezinksel van epitheelfragmenten en weefselresten komt, hetgeen het aflezen van de reactie natuurlijk zeer bemoeilijkt.

TANAKA (1) [1]) en FREYER (2) beweren eene praecipitatie-reactie regelmatig te hebben gevonden; v. PROWAZEK (l. c.) v. PIRQUET (l. c.) en GASTINEL (l. c.) daarentegen konden de reactie niet aflezen.

Viruliclde Stoffen. Belangrijker zijn de onderzoekingen naar de aanwezigheid van viruliclde stoffen in het bloedserum. Deze onderzoekingen zijn gedaan 1°. door middel van het dierexperiment (dus door *passieve immuniseering*) en 2°. in vitro.

In 1890 vonden STRAUS, CHAMBON en MÉNARD (3) dat het mogelijk is immuniteit bij het kalf op te wekken door transfusie van bloed van een ander kalf, dat eene volle vaccinale eruptie heeft (ongeveer 7 dagen na de enting),

---

1) Literatuur aan het slot van dit Hoofdstuk.

indien groote hoeveelheden (4, 5 tot 6 L.) getransfundeerd worden. Zij trokken uit deze observatie de conclusie dat de vaccineverwekker in zeer kleine quantiteit in het bloed voorkomt gedurende de periode van de eruptie.

Later (1896) kwamen BÉCLÈRE, CHAMBON en MÉNARD (4) op grond van hunne onderzoekingen tot de volgende conclusies: Het serum van het gevaccineerde kalf, opgevangen 10 tot 50 dagen na de vaccinatie, bezit immuniseerende eigenschappen. Deze immuniseerende eigenschap openbaart zich zeer snel, in tegenstelling met hetgeen wij zien bij de onderhuidsche toediening van de vaccine, waarbij de immuniteit zich zeer langzaam ontwikkelt.

Deze snelheid der immuniseerende actie van het serum is voldoende om te bewijzen, dat dit serum die immuniseerende eigenschap te danken heeft aan opgeloste substanties en niet aan de tegenwoordigheid van massa's vaccineverwekkers. (Dus eene zuivere passieve immuniteit.)

Deze proeven over passieve immuniseering werden later weer opgevat. L. CAMUS (5) geeft op, dat, wanneer men een versch konijn per K.G. dier 10 c.c. serum van een gevaccineerd konijn intraveneus inspuit, dat konijn minstens eene partieele immuniteit verkrijgt. De preventieve kracht is dezelfde of de injectie 10 dagen of enkele minuten voor de enting geschiedt, m. a. w. „de immuniteit heeft geen incubatie noodig"; een feit ook reeds door BÉCLÈRE en zijne medewerkers waargenomen. Wil men eene totale immuniteit verkrijgen dan moet men ongeveer eene even groote hoeveelheid serum inspuiten als het dier aan bloed heeft. Het serum werkte niet meer na het 5e uur na de enting. HENSEVAL en CONVENT (6) zagen dat eene inspuiting tot 48 uur na de enting nog werkte. GASTINEL (7) zag, dat de

reactie op vaccinale huidenting door injectie van 6 c. c. variolaserum, indien 2—6 dagen van te voren of hoogstens 48 uur na de enting ingespoten kon gemodifieerd worden.

Teissier en P. L. Marie (8) deden onderzoekingen over de serotherapie bij variola. 13 Patienten werden ingespoten met variolaserum, 8 genazen, 5 stierven. De schrijvers zagen in alle gevallen 24 tot 48 uur na de injectie eene verbetering van den algemeenen toestand optreden.

Ook *in vitro* konden Béclère, Chambon en Ménard (9) het virulicide vermogen van het serum aantoonen.

Ongeveer terzelfder tijd toonde Sternberg (10) aan dat een druppel vaccinelymphe, gemengd met 4 druppels serum van een 14 dagen tevoren gevaccineerd kalf, na één uur contact, het vermogen verliest om eene vaccinale eruptie te verwekken.

Ook op grond van onderzoekingen van anderen als Camus (11 en 12) v. Prowazek en Halberstädter (13) v. Prowazek en Aragâo (14) Henseval en Convent (6) en Teissier en Gastinel (15), die allen volgens de door Sternberg aangegeven methode te werk gingen, mogen we besluiten dat eene virulicide werking tegenover vaccinelymphe uitgaat van het serum van geënte menschen en van variolareconvalescenten, alsook van het serum van kutaan, subkutaan, intraveneus en langs digestieven weg met vaccine behandelde dieren (aap, kalf, paard en konijnen).

Er bestaan echter meeningsverschillen over den tijd waarop de virulicide stoffen in het serum komen en daaruit verdwijnen en over het verband hiertusschen en de huidimmuniteit.

Terwijl Camus (l. c.) en Gastinel (l. c.) de vaccinale immuniteit van de huid afhankelijk vonden van het gehalte

van het serum aan virulicide antistoffen, nemen andere autoren eene dergelijke afhankelijkheid niet aan. Integendeel wijzen zij er op dat de antistoffen uit het serum kunnen verdwijnen lang voordat de huid ophoudt immuun te zijn. HENSEVAL en CONVENT (6) en ook SÜPFLE (16) wijzen er met nadruk op dat de huidimmuniteit zich ook vaak eerder uit dan dat de virulicide kracht van het serum haar hoogtepunt heeft bereikt.

In de derde plaats dan is in het serum gezocht naar stoffen die met het vaccineantigeen te samen complement binden. En waar ik, mede in verband met mijne onderzoekingen in Hoofdstuk III te beschrijven, de waarde van de complementbindingsreactie nauwkeurig wilde leeren kennen, wilde ik ietwat nader op de onderzoekingen van anderen over dit onderwerp ingaan. Ook hier: de meest uiteenloopende opgaven. **Complementbindende stoffen.**

De eerste die de complementbindingsreactie bij de vaccine toepaste was JOBLING (17). JOBLING gebruikte als antigeen goed fijngewreven, met 0,85 % keukenzoutoplossing behandeld, pokpuistenextract. Als sera gebruikte hij sera van geënte en niet geënte kalveren. Tusschen het antigeen en het serum van geënte kalveren zag hij eene zwak positieve complementbindingsreactie optreden. Deze proeven zijn niet overtuigend, daar elke nadere contrôleproef gemist wordt.

HELLER en TOMARKIN (18) gingen voor het antigeen uit van versche vaccinelymphe die goed fijn werd gewreven met eene physiologische zoutoplossing en daarna geschud en gecentrifugeerd werd. Zij vonden het een groot bezwaar dat zij geen mooi helder antigeen konden krijgen. Zij namen als serum het serum van een jong rund dat geënt was en daarna

meerdere malen met lymphe intraveneus was geïnjiceerd. Hunne proeven vielen negatief uit.

Beintker (19) zag in 3 gevallen eene complementbindingsreactie optreden tusschen het serum van variolalijders en koepokkenlymphe als antigeen. Ook verkreeg hij die reactie tusschen het serum van met variolamateriaal of met vaccinelymphe ingespoten konijnen en vaccinelymphe als antigeen.

Bermbach (20) kreeg negatieve resultaten. Hij gebruikte als antigeen $^1/_{50}$ verdunde lymphe en kon hiermede nòch met het serum van kutaan geënte caviae, nòch met het serum of extract uit milt en lever van kutaan of subkutaan geënte konijnen, die hij 8 weken na de enting doodde, eene complementbindingsreactie vinden. Ook kon hij op deze wijze geen complementbindende stoffen aantoonen in het serum van 34 gevaccineerde en gerevaccineerde menschen. Dat deze onderzoekingen, meerendeels langer dan 10 jaar na de vaccinatie ingesteld, negatief uitvielen mag ons, in verband met hetgeen wij omtrent den duur der vaccine-immuniteit weten, niet verwonderen. Hijzelve veronderstelt als oorzaak van het negatief uitvallen van zijne experimenten dat de lymphe, die als antigeen gebruikt wordt, niet genoeg gemacereerd was, zoodat de als antigeen werkzame bestanddeelen nog opgesloten zouden zitten.

Sugai (21) daarentegen verkreeg positieve resultaten met het serum van variolalijders en pokpuisteninhoud of koepokkenlymphe als antigeen. Ook geeft Sugai de aanwezigheid van dergelijke stoffen op in het serum van gevaccineerden.

Dahm (22) vond met als antigeen verdunde vaccinelymphe $^1/_{10}$ eene positieve reactie bij den pokkenlijder, die echter

snel na de ziekte verdween. Bovendien toonde hij deze reactie aan tusschen variolalymphe als antigeen en extract uit lever en milt van eene vrouw, die aan variola was gestorven.

Xylander (23) onderzocht het serum van gevaccineerden en van variolalijders. Op 31 onderzoekingen vond hij 18 maal eene positieve reactie. Het komt hem voor dat de reactie bij variola meer voorkomt dan bij vaccine.

Kryloff (24) geeft eenen positieven uitslag op van de reactie bij variolois en variola met pokpuistextract in physiologische zoutoplossing als antigeen. Ook hij wijst op een snel verdwijnen van de reactie na de ziekte.

Casagrandi (25) beschrijft de complementbindingsreactie van het serum van dieren die op verschillende wijzen met vaccinefiltraten zijn behandeld. Als antigeen gebruikte hij ruwe vaccine in verdunning $^1/_{10}$ of ook soms gefiltreerde geconcentreerde vaccine. Hij zag met het serum van een bij herhaling intraveneus ingespoten hond, eene positieve complementbindingsreactie. Hetzelfde trad op na subkutane injectie. Terwijl hij daarentegen na huidenting nooit eene positieve complementbindingsreactie zag optreden.

Casagrandi (26) vond ook in het serum van pokkenlijders antilichamen tegenover kalverenlymphe. Eveneens bond het serum van den gevaccineerden hond met variola-antigeen tesamen complement.

Ook Paschen (27) deed dergelijke proeven tesamen met Jacobsthal. Hij gebruikte als antigeen vaccinelymphe van geënte kinderen, afgenomen op den 7^en^ dag na de inenting, die dan met physiol. zout $^1/_{75}$ en $^1/_{150}$ verdund werd. Hij kon tusschen dit antigeen en serum van geënte konijnen en kalveren de complementbindingsreactie zien optreden.

Hallwachs (28) bereidde het antigeen door bij de, door dialisatie van zijne glycerine bevrijde, vaccinelymphe de viervoudige hoeveelheid keukenzout van 0,85 % te voegen. Deze vloeistof kwam ½ uur op 56° C. en daarbij werd 0,5 % phenol gevoegd [1]). Na centrifugeeren en nadat de vloeistof eenige dagen in de ijskast had gestaan verkreeg hij eene nauwelijks opalesceerende vloeistof die lang goed bleef. Hij vond dat in de sera van kutaan met lapine geënte konijnen met dit antigeen complementbindende stoffen aan te toonen waren van den 9^{en} tot den 14^{en} dag na de enting. Vóór en nà dien tijd kon hij ze niet in het serum aantoonen. Bij herhaald intraperitoneaal geënte konijnen waren op den 7^{en} tot 12^{en} dag na de laatste injectie complementbindende stoffen aan te toonen. Met extracten van epidermis, beenmerg en lever kon 12 dagen na kutane enting geen specifieke complementbinding worden gevonden.

Shiga en Kii (29) zagen de antilichamen reeds den 5^{en} tot 10^{en} dag na de vaccinatie in het kalverenserum optreden; dit bereikte tegen de 30 dagen zijn hoogtepunt, en bleef minstens 10 maanden op dit maximum. Bij 16 onderzochte sera van variolareconvalescenten vonden zij regelmatig de reactie.

Bij het gebruiken van orgaanextracten van gevaccineerde kalveren trad slechts lichte binding op, terwijl het serum eene sterke binding vertoonde.

Gastinel (7) verrichtte de complementbindingsreactie bij gevaccineerde menschen en dieren. Speciaal zijn zijne

---

[1]) Het komt mij voor dat deze inactiveering van het antigeen niet noodzakelijk en niet gewenscht is, daar ik aantoonde dat de gevoeligheid van de reactie door een verblijf van het antigeen bij 56° gedurende ½ uur, belangrijk verminderd werd.

onderzoekingen gericht op het vinden van het moment van optreden en verdwijnen van de reactie; op het aantoonen van een mogelijk parallellisme tusschen de complementbindende kracht en het virulicide vermogen van het serum; en op het vinden van een verband tusschen de serumreacties en de klinische verschijnselen bij revaccinatie. Voor de antigeenbereiding gaat hij uit van versche ruwe stof, den 4^{en} of 5^{en} dag na de enting van het kalf afgeschrapt. Deze werd dan altijd binnen de 2 uur nadat zij was afgeschrapt gebruikt. De pulpa werd met eene hoeveelheid physiologische zoutoplossing, zóó dat de verdunning $^{1}/_{50}$ werd, goed fijngewreven in den mortier. Deze emulsie kwam $^{1}/_{2}$ tot 1 uur in de ijskast en werd daarna snel even gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof, iets opalescent, werd dan steeds onmiddellijk gebruikt.

Hiermede verrichtte hij:

1. Complementbindingsreactie bij *gevaccineerde menschen.* Hier zag hij de reactie niet constant optreden. Van 10 observaties waren 6 positief en 4 negatief.
   Hij vond eene positieve reactie van den 5^{den} tot den 15^{den} dag na de vaccinatie.
2. Complementbindingsreactie bij *experimenteele huidvaccinatie.*
   a. bij het kalf (aantal dagen niet vermeld). Positieve complementbindingsreactie.
   b. bij apen. Vroegtijdig optredende en snel verdwijnende complementbindingsreactie.
   c. bij honden. Idem.
   d. bij konijnen zag hij de complementbindingsreactie soms ontbreken. Vóór den 7^{en} dag nooit, soms ook pas later optreden.

De opgaven van GASTINEL zijn in tegenspraak met die van HALLWACHS (die nooit na den 14en dag de reactie zag); want GASTINEL vond bij verschillende konijnen nog eene positieve eompl.-bindingsreactie den 15en, 16en, 18en, 19en, 22sten, 23sten, 27sten, 34sten en 35sten dag na de enting. Later kon hij nooit de reactie aantoonen.

3. Complementbindingsreactie bij *subkutaan ingespoten konijnen*. Hij onderzocht 8 konijnen, die deels met kleine, herhaalde doses (1/2 c. c. 1/200) deels met zwakke, niet herhaalde dosis (1 e. c. 1/100) waren ingespoten.

   Bij 5, waarbij totale immuniteit optrad, vond hij het serum sterk bindend; bij de 3, waarbij de immuniteit sleehts gedeeltelijk bleek, vond hij eene zwakke reaetie. De eomplementbindingsreaetie verscheen snel, maar verdween geregeld ongeveer den 15en dag.

4. Complementbindingsreactie bij *intraveneus geënte konijnen*. Bij 10 van de 11 aldus behandelde konijnen trad volkomen immuniteit op, en bij dezen vond hij constant complementbindende stoffen in het serum. Deze traden vroeg (7en tot 10en dag) op en verdwenen altijd den 24sten dag. Hij zag dat ééne injectie van betrekkelijk zwakke dosis (2 c.c. vaecinelymphe 1/100) voldoende was om het dier volkomen immuun te maken.

5. Complementbindingsreactie bij *konijnen, langs den digestieven weg met vaccine behandeld.*

   Bij 6 konijnen, waarbij hij, na het inbrengen van de oesophagussonde, eene suspensie van 4 gram geglyc. vaecine in 5 c.e. physiologische zoutoplossing in de maag bracht, trad geen immuniteit op.

   Bij 5 aldus behandelden was de immuniteit eehter totaal en in het serum van dezen vond hij constant van den 12en tot den 28sten dag complementbindende stoffen.

6. Complementbindingsreactie bij *konijnen gevaccineerd langs intra-peritonealen weg.*

Bij 12 konijnen bracht GASTINEL vaccine in de buikholte, hetzij door middel van collodionzakjes, hetzij door directe inspuiting.

Bij directe inspuiting zag GASTINEL geen complementbindende stoffen in het serum verschijnen, terwijl deze bij het gebruik van collodionzakjes van groote dosis vaccinelymphe, wèl optraden.

Ook zocht GASTINEL door middel van de complementbindingsreactie naar vaccinale antilichamen in de organen.

Nadat de organen uit het lichaam waren gehaald, werd een stukje ervan fijngeknipt en lang gewasschen om het bloed eruit te krijgen en vervolgens de stukjes gemalen in eene physiologische oplossing van keukenzout. Dit papje werd onder de luchtpomp geplaatst en na 2 dagen ontstond een fijn poeder. Hiervan 1 gram met 10 c. c. physiologische zoutoplossing kwam 2 uur in de ijskast. Daarna werd het snel gecentrifugeerd en de bovenkomende vloeistof gebruikt. Hij geeft de volgende resultaten op:

Konijn 1. (kutaan geënt).
7 dagen na de enting: miltextr. en serum: negat. c.b.r.

Konijn 2. (idem.)
18 dagen na de enting: leverextr., miltextr. en serum: negatieve c.b.r.

Konijn 3. (idem.)
19 dagen na de enting: leverextr.: zw. pos. c.b.r.
miltextr.: negat. c.b.r.

Konijn 4. (idem.)
6 dagen na de enting: serum: neg. c.b.r.
leverextr.: pos. c.b.r.
miltextr.: neg. c.b.r.

Konijn 5 (langs digestieven weg met vacc. behandeld).
12 dagen na de toediening: serum: pos. e.b.r.
31 „ „ „ „ : serum: neg. e.b.r.
miltextr.: neg. e.b.r.
leverextr. pos. e.b.r.

Konijn 6 (als 5).
12 dagen na de toediening: serum: pos. e.b.r.
21 „ „ „ „ : miltextr.: neg. e.b.r.
nierextr.: neg. e.b.r.
leverextr.: pos. e.b.r.

Konijn 7 (langs intraperiton. weg behandeld).
5 dagen na inbrenging van collodionzakje: serum: pos. e.b.r.
12 „ „ „ „ „ : miltextr : neg. e.b.r.
leverextr.: pos. e.b.r.

Konijn 8 (langs intraveneuzen weg behandeld).
10 dagen na de injectie: serum: pos. e.b.r.
18 „ „ „ „ : serum: zw. pos. e.b.r.
23 „ „ „ „ : miltextr.: neg. e.b.r.
leverextr.: neg. e.b.r.

Konijn 9 (als 8).
3 dagen na de laatste van 5 injecties 1 c.c. 1/100 : serum : pos. e.b.r.
9 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ : serum : pos. e.b.r.
16 „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ : leverextr. : neg. e.b.r.
miltextr. : neg. e.b.r.

Het valt op dat GASTINEL, bij langs den digestieven weg en intraperitoneaal met vaccine behandelde dieren constant complementbindende stoffen in de lever kon aantoonen. Het is jammer dat hij de lever van nog langer te voren behandelde dieren niet aan een dergelijk onderzoek onderwierp om het tijdstip na te gaan waarop deze stoffen eventueel ook uit de lever verdwenen.

GASTINEL onderzocht ook nog het serum van 36 variolalijders. Met uitzondering van 3 gevallen was de complementbindingsreactie steeds aanwezig gedurende het stadium der suppuratie en verdween ongeveer den 30sten dag.

In den laatsten tijd werd de reactie nog toegepast door KLEIN (30) en VON KOUSCHEGG (31).

KLEIN vond regelmatig in het serum van pokkenlijders antilichamen die met pokpuistantigeen complement bonden.

VON KOUSCHEGG vond de reactie constant in het serum van variolalijders (40) met het waterig extract van versche pokkorsten als antigeen.

Het is moeilijk, naar aanleiding van de verschillende genoemde onderzoekingen, zich eene meening te vormen. Waar door de diverse onderzoekers telkens weer eene andere methode gevolgd wordt en vaak de noodige contrôleproeven worden gemist, daar is het bezwaarlijk de dikwijls uiteenloopende resultaten naar hunne waarde te schatten; en dus mocht niet het bestaan van eene specifieke complementbindingsreactie tusschen een vaccine-immuunserum en een vaccine-antigeen als bewezen worden aangenomen.

Eigen experimenten met de compl. bindingsreactie.

Antistoffen in het serum.

Ik meen, voor goed begrip der zaken, goed te doen met uiteen te zetten hoe de proeven door mij werden verricht en daarvan de resultaten weer te geven, om daarna te vermelden wat op de betrouwbaarheid dezer proeven valt aan te merken en hoe ik gemeend heb hieraan door contrôleproeven te gemoet te komen. Voor het uitvoeren der complementbindingsreactie met het serum van verschillend voorbehandelde konijnen worden vereischt:

a. het antigeen.

b. het te onderzoeken serum.

c. complement.

d. een amboceptor tegen roode schapenbloedlichaampjes.

e. eene suspensie van roode schapenbloedlichaampjes.

Antigeen. Aan een *goed antigeen* moesten de volgende eischen worden gesteld:

1°. mag het zelf geen complement bevatten.

2°. mag het zelf geen haemolytische eigenschappen bezitten.

3°. moet het vrij zijn van grovere partikeltjes.

4°. mag het in de dubbele hoeveelheid van die, welke voor de reactie gebruikt wordt, niet zóóveel complement tot zich trekken dat daardoor het optreden eener complete haemolyse verhinderd wordt.

Ik ben begonnen te werken met geglycerineerde vaccinelymphe verdund met physiologische zoutoplossing, maar voelde weldra de bezwaren: dat dit antigeen niet vrij van grovere partikels was en bovendien eerst in verdunning gemiddeld van $^1/_{250}$ in hoeveelheid van 0,25 c.M.^{3} zelf geen complement meer bond. Vandaar dat ik een antigeen heb bereid op andere wijze; nl. zooals door CASAGRANDI (l. c.) is aangegeven doch met enkele wijzigingen. Eene afgewogen hoeveelheid geglycerineerde lymphe wordt $^1/_{50}$ verdund met physiologische zoutoplossing. Dit mengsel wordt driemaal in de electrische centrifuge met zoutoplossing (0,85 $^0/_0$) afgewasschen. Het waschwater van de twee laatste malen wordt dan voor een deel gebruikt om het sediment in eenen sterielen mortier gedurende $^3/_4$ uur goed fijn te wrijven, onder toevoeging van eene hoeveelheid waschwater van 14 maal het oorspronkelijk gewicht van de vaccinelymphe.

Dit mengsel wordt een kwartier geschud in een schudapparaat, daarna in de centrifugebuis gedaan, de centrifuge even aangezet, en de bovenkomende vloeistof voorzichtig afgepipetteerd en door een papieren vouwfilter gefiltreerd. Ik verkreeg daardoor eene homogene, licht

opalesceerende vloeistof die, zooals blijken zal, zeer goed aan de bovengestelde eischen voldeed.

Ik heb, om mij te overtuigen dat in deze vloeistof het vaccinevirus aanwezig was, met deze vloeistof ook nog entingen bij kinderen verricht; met zeer bevredigend resultaat, daar van de *30* scarificaties zich *22* tot volslagen ontwikkelde pokpuisten ontwikkelden. (dus ongeveer 70 %).

Regelmatig heb ik het antigeen voor elke proef weder versch bereid; en moest dus telkens (zie voorproeven) het antigeen onderzoeken op eigen bindend vermogen en eventueele eigene haemolytische eigenschappen.

Als *serum* gebruikte ik het bloedserum van op verschillende wijzen met vaccine voorbehandelde konijnen; dit serum werd ½ uur bij 56° C. in een waterbad geplaatst en daardoor geïnactiveerd. **Serum.**

Deels werden de konijnen op de rughuid geënt, volgens de door CALMETTE en GUÉRIN (32) aangegeven methode, met dien verstande dat bovendien de huid nog gescarificeerd werd. De rughuid werd nl. met schaar en tondeuse kaalgeknipt, daarna ingezeept en zorgvuldig geschoren en de zeep met veel flink warm water afgespoeld. Op deze huid werden met de vaccinostyle van MARÉSCHAL scarificaties ter lengte van 3 à 4 cM. gemaakt en daarna de huid ongeveer 20 minuten lang met vaccine ingewreven.

Verder werden weer andere konijnen intraperitoneaal, subkutaan, en intraveneus met vaccineverdunningen ingespoten.

De vloeistof, die ik voor de verschillende injecties gebruikte, werd gemaakt door eene hoeveelheid vaccinelymphe met de, voor de aangegeven verdunning, benoodigde hoeveelheid 0,85 % zoutoplossing, een half uur in den mortier

fijn te wrijven en daarna de vloeistof even in de electrische centrifuge te laten draaien.

Wat de intraveneuze injecties betreft dient nog vermeld dat $2^1/_2$ cM.^{3} van eene verdunning $^1/_{10}$ het maximum bleek dat ik inspuiten kon; want de beide keeren dat ik trachtte meer in te spuiten zag ik bij het dier, direct in aansluiting aan de injectie, benauwdheid, krampen, wijde, niet reageerende pupil optreden en stierf het dier onder het beeld van de „anaphylaktische shock" binnen enkele minuten; mogelijk door primaire giftigheid van het antigeen.

Het bloed werd, na zorgvuldige desinfectie van het oor met alkohol en aether, uit eene oorvene opgevangen. Regelmatig werd voor elke proef dit serum onderzocht op eigen bindend vermogen en enkele malen ook op eigen haemolytische eigenschappen. Het eigen bindend vermogen van de verschillende sera loopt zeer uiteen, zoodat zeer nauwkeurig de verdunning waarbij dit vermogen wegviel, telkens weer moest worden bepaald. (Zie voorproeven.)

Complement. Hiervoor werd versch caviaserum genomen.

Amboceptor. Als amboceptor werd gebruikt het serum van een konijn, voorbehandeld met vier intraperitoniale inspuitingen resp. van 2, 4, 8 en 12 cM^3. zeer goed gewasschen schapenchromocyten.

0,1 cM^3 van dit serum $^1/_{1000}$ geeft met 0,25 cM^3. complement $^1/_{10}$ en 0,25 cM.^{3} 5 % schapenchromocytenoplossing complete haemolyse.

Suspensie van roode bloedlichaampjes. Hiervoor nam ik eene 5 % suspensie van in zoutsolutie van 0,85 % goed gewasschen, schapenchromocyten.

Het lijkt mij niet noodzakelijk de verslagen van alle gedane proeven weer te geven. Veel overzichtelijker lijkt het mij den gang eener proef nauwkeurig te beschrijven

en daarna in eene tabel de uitkomsten der verschillende proeven neer te leggen. Ik acht het overbodig ook de proeven te vermelden die mislukt zijn en waar de reactie door de eene of andere fout in de proef niet was af te lezen. Een ieder die zich met de complementbindingsreactie heeft bezig gehouden, zal hebben ondervonden, dat op dit gebied voetangels en klemmen liggen, waardoor men zich op de meest onverwachte momenten gegrepen ziet en waardoor het onmogelijk wordt gemaakt eenige conclusie uit de proef te trekken.

Verloop der proeven.

Voorproeven.

(33). Daar ik voor iedere proef weer, moest weten in welke verdunningen ik het antigeen, het serum, het complement en de amboceptor tegen schapenbloedlichaampjes bijeen moest voegen, waren de volgende voorproeven onvermijdelijk [1]).

1. Chromocyten-amboceptortitratie.

Deze verrichtte ik naar het volgende schema:

	0,85 % Zoutopl.	Amboceptor 1/1000.	Complement 1/10.	5% Chrom.opl.
1	0,25	0,5	0,25	0,25
2	0,4	0,35	0,25	0,25
3	0,5	0,25	0,25	0,25
4	0,6	0,15	0,25	0,25
5	0,65	0.1	0,25	0,25
6	0,75	0	0,25	0,25

Hieruit kon ik aflezen welke hoeveelheid amboceptor

---

1) In het begin deed ik mijne proeven met behulp van de broedstoof, eerst later kwam ik in de gelegenheid van een waterbad, dat op permanente temp. van 37° wordt gehouden, gebruik te maken en kon, juist doordat ik op éénen dag voorproeven en eigenlijke proef achter elkaar te verrichten had, ruimschoots de voordeelen van het waterbad gewaar worden. (34)

met deze hoeveelheden complement en chromocytenoplossing na verblijf van een uur in de broedstoof of ½ uur in een waterbad van 37° C. complete haemolyse geeft. Ik gebruikte dan voor de volgende proeven 2,5 maal de hoeveelheid amboceptor die in staat bleek nog juist complete haemolyse te geven, in verdunning omgerekend tot eene hoeveelheid van 0,25 cM.³ en verrichtte daarmede de *complementtitratie*.

2. Complement-titratie.

	0,85% Zoutopl.	Complement 1/40.	Amboceptor in de boven gevonden verdunning.	5 % Chrom.opl.
1	0,25	0,5	0,25	0,25
2	0,35	0,4	0,25	0,25
3	0,45	0,3	0,25	0,25
4	0,5	0,25	0,25	0,25
5	0,55	0,2	0,25	0,25
6	0,75	0	0,25	0,25

Uit deze reeks buisjes kon ik aflezen welke hoeveelheid complement tesamen met de gebruikte hoeveelheid amboceptor, nog net, en welke hoeveelheid net niet meer complete haemolyse gaf. Daar ik bij de verdere proeven met stoffen te werken kreeg, waarvan ik kon veronderstellen dat zij zelve complement bonden nam ik de halve hoeveelheid complement meer, dan die hoeveelheid die nog net complete haemolyse van het haemolytisch systeem had gegeven, in verdunning omgerekend tot eene hoeveelheid van 0,25 cM.³, en verrichtte hiermede de *titratie der sera en van het antigeen.*

3. Titratie der sera en van het antigeen.

	0,85 % Zoutopl.	Antigeen of Serum.	Compl. (in gevonden verdunning).		Amboceptor (in gevonden verdunning).	5 % chrom.-opl.
		Vacc. ant. onverdund		Verblijf van 1 uur in waterbad v. 37° C.		
1	0	0,5	0,25		0,25	0,25
2	0,15	0,35	0,25		0,25	0,25
3	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,35	0,15	0,25		0,25	0,25
5	0	1/5 0,5	0,25		0,25	0,25
6	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
		Te onderzoek. sera				
1	0	1/10 0,5	0,25		0,25	0,25
2	0,15	0,35	0,25		0,25	0,25
3	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,35	0,15	0,25		0,25	0,25
5	0	1/50 0,5	0,25		0,25	0,25
6	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
					0,85 % Zoutopl.	
		Vacc. ant. onv.				
1	0	0,5	0,25		0,25	0,25
2	0,1	0,4	0,25		0,25	0,25
3	0,2	0,3	0,25		0,25	0,25
4	0,3	0,2	0,25		0,25	0,25
5	0,5	0	0,25		0,25	0,25

Uit deze titratie nu viel het volgende af te lezen:

a. de hoeveelheid *antigeen* die het optreden eener complete haemolyse niet belemmert. In den regel vertoonden alle buisjes complete haemolyse; bij uitzondering was het eerste buisje bijna compleet en de rest compleet. Constant kon ik als grootste hoeveelheid antigeen bij de eigenlijke proef 0,3 van het onverdunde antigeen gebruiken.

b. de hoeveelheid *serum* die het optreden eener complete haemolyse niet belemmert.

Deze hoeveelheid liep bij de verschillende sera nog al eens uiteen. Waar in den regel de grens lag tusschen 0,5 en 0,35 van serum 1/10 daar viel de eigen remming bij andere

sera eerst bij sterker verdunning weg en moest ik dus bij de eigenlijke proef eene sterkere serumverdunning gebruiken. Om bij het aflezen der eigenlijke proef niet in moeilijkheden te geraken doordat bij de samenvoeging van antigeen en serum in hoeveelheden die ieder voor zich de haemolyse net niet meer remden, mogelijk toch eene remming der haemolyse kon optreden en daardoor dus de contrôles geen complete haemolyse zouden vertoonen, nam ik, voor de eigenlijke proef, van beiden ongeveer de helft van de hoeveelheid die de haemolyse net niet meer bleek te remmen.

c. Nooit vond ik dat het *antigeen* onverdund in hoeveelheid van 1 cM.^{3} zelf haemolytische eigenschappen had.

Dat het *serum* in de gebruikte verdunning geen haemolytische eigenschappen vertoont, nam ik als vaststaand aan, na contrôleproeven.

Na deze voorproeven, die vóór *elke* proef met *alle* de te gebruiken antigenen en sera werd verricht, werd de eigenlijke proef ingezet. Reeds nu wil ik, zonder vooruit te loopen op de verdere contrôleproeven, die ik later zal mededeelen, vermelden dat ik steeds naast de te onderzoeken sera, het serum van volkomen gezonde onvoorbehandelde konijnen als contrôleserum gebruikte. In den regel bond dit serum met het vaccine-antigeen geen complement; in de enkele gevallen dat dit wel zoo was, was de binding zóó gering dat het verschil in reactie tusschen dit contrôleserum en de sera der voorbehandelde konijnen zoo duidelijk was, dat het aflezen der reactie daardoor niet belemmerd werd.

Eigenlijke proef.

	0,85% zout-opl.	Antigeen.	Serum.	Complement (gevonden verd.)		Amboceptor (gevonden verd.)	5 % chr.-opl
		in de gevonden verdunning [1])	te onderzoeken serum in de gevonden verdunning [2])		Verblijf van 1 uur in waterbad van 37° C.		
1	0,2	0,3	0,25	0,25		0,25	0,25
2	0,3	0,2	0,25	0,25		0,25	0,25
3	0,4	0,1	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,5	0	0,25	0,25		0,25	0,25
		als boven [1])	contrôle-serum als boven [2])				
1	0,2	0,3	0,25	0,25		0,25	0,25
2	0,3	0,2	0,25	0,25		0,25	0,25
3	0,4	0,1	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,5	0	0,25	0,25		0,25	0,25
1	0,25	0	te ond. serum [2]) 0,5	0,25		0,25	0,25
2	0,25	0	contr. serum [2]) 0,5	0,25		0,25	0,25
1	0,25	0,5	0	0,25		0,25	0,25
2	0,4	0,35	0	0,25		0,25	0,25
3	0,5	0,25	0	0,25		0,25	0,25
4	0,6	0,15	0	0,25		0,25	0,25
5	0,75	0	0	0,25		0,25	0,25

De buisjes bleven hetzij 1¼ uur in de broedstoof, hetzij 1 uur in het waterbad en daarna, na de toevoeging van amboceptor en chromocytenoplossing, wederom een uur in de broedstoof of ½ uur in het waterbad. Dan werd de reactie afgelezen. Een *eerste vereischte* hiervoor was, dat in de contrôlebuisjes (antigeencontrôle en enkele serumcontrôle) complete haemolyse was opgetreden.

Was deze niet compleet dan werd regelmatig de reactie

---

[1]) In den regel onverdund.

[2]) In den regel verdunning 1/10.

als mislukt beschouwd. In de buisjes waarin de dubbele hoeveelheid serum, zonder antigeen, mocht dan eene lichte remming der haemolyse zijn opgetreden, maar gewoonlijk waren ook deze compleet. Aldus te werk gaande werd door mij onderzocht het serum van 28 konijnen.

Resultaat der onderzoekingen.

Het resultaat dezer onderzoekingen is neergelegd in de volgende tabel.

TABEL I.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der Complement-bindings-reactie.
I.	Rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven.	2 dg. na de enting.	negatief.
		6 „ „ „ „	zwak pos.
		11 „ „ „ „	positief.
		16 „ „ „ „	negatief.
II.	subkutaan 2½ c. c. vaccineverd. 1/30	2 dg. na subkut. inj.	negatief.
		5 „ „ „ „	negatief.
	en 5 dg. later	11 „ „ „ „	positief.
	intraperitoneaal 4 c.c. vaccineverd. 1/30.	6 „ „ intraper. „	
		18 „ „ subkut. „	zwak pos.
		13 „ „ intraper. „	
III.	intraveneus in oorvene 2 c.c. vacc. 1/30	4 dg. na intraven. inj.	negatief
		9 „ „ „ „	zwak pos.
	en 5 dg. later	4 „ „ intraper. „	
	intraperitoneaal 4 c. c. vacc. 1/30	20 „ „ intraven. „	positief.
	en 7 dg. daarna	15 „ „ intraper. „	
	subkutaan 3 c.c. vacc. 1/10.	8 „ „ subkut. „	
	12 dg. hierna wordt het dier verbloed uit de Art. carotis.	24 „ „ intraven. „	zeer sterk pos.
		19 „ „ intraper. „	
		12 „ „ subkut. „	
IV.	intraveneus in oorvene 2 c.c. vacc. 1/30	4 dg. na intraven. inj.	negatief.
		9 „ „ „ „	negatief.
	5 dg. later	4 „ „ intraper. „	
	intraperitoneaal 4 c. c. vacc. 1/30 en 7 dg. daarna	20 „ „ intraven. „	positief.
		15 „ „ intraper. „	
	subkutaan 3 c. c. vacc. 1/10.	8 „ „ subkut. „	

<table>
<tr><th>Konijn</th><th>Wijze van voorbehandeling.</th><th>Tijd van de proef.</th><th>Resultaat der Complement-bindings-reactie.</th></tr>
<tr><td>IV.
(vorv.)</td><td>Herenting: 4 maanden na de eerste injectie rug geschoren, gescarificeerd en met vacc. ingewreven.
Binnen 24 uur vertoonen de lijnen van de scarificaties roodheid, die weldra teruggaat.
Verder geen reactie.</td><td>24 dg. na intraven. inj.
19 " " intraper. "
12 " " subkut. "
34 " " intraven. "
29 " " intraper. "
22 " " subkut. "
41 " " intraven. "
36 " " intraper. "
29 " " subkut. "</td><td>} positief.
} zwak pos.
} negatief.</td></tr>
<tr><td>V.</td><td>rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven.</td><td>5 dg. na de enting.
8 " " " "
11 " " " "
15 " " " "
20 " " " "</td><td>negatief.
positief.
positief.
positief.
negatief.</td></tr>
<tr><td>VI.</td><td>rug geschoren, gescarificeerd en met lapine ingewreven.</td><td>6 dg. na de enting.
11 " " " "
13 " " " "
27 " " " "</td><td>zwak pos.
positief.
zwak pos.
negatief.</td></tr>
<tr><td>VII.</td><td>rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven.
12 dg. hierna overleden.</td><td>6 dg. na de enting.
11 " " " "</td><td>negatief.
zwak pos.</td></tr>
<tr><td>VIII.</td><td>subkutaan 4 c. c. vaccine $^1/_{10}$ ingespoten.</td><td>4 dg. na de injectie.
7 " " " "
10 " " " "
20 " " " "</td><td>negatief.
positief.
positief.
negatief.</td></tr>
<tr><td>IX.</td><td>intraveneus 3 c. c. vacc. $^1/_{30}$ ingespoten in oorvene.</td><td>4 dg. na de injectie
7 " " " "
13 " " " "</td><td>negatief.
positief.
negatief.</td></tr>
<tr><td>X.</td><td>intraveneus 3 c. c. vacc. $^1/_{30}$ in oorvene gespoten.
Herenting: 4 maanden nadien rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven. Vertoont alleen eene vroegreactie.</td><td>4 dg. na de injectie.
7 " " " "
10 " " " "
13 " " " "
4 md. " " "</td><td>negatief.
positief.
positief.
zwak pos.
negatief.</td></tr>
</table>

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der Complement-bindings-reactie.
XII.	intraperitoneaal 3 c.c. vacc. $^{1}/_{10}$ ingespoten. 5 dg. daarna. intraperitoneaal 4,5 c.c. vacc. $^{1}/_{10}$ 7 dg. hierna verbloed uit de Art. carotis.	4 dg. na de 1e injectie. 11 „ „ „ 1e „ 6 „ „ „ 2e „	negatief. } sterk pos.
XIII.	rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven. 12 dg. hierna subkutaan ingespoten $2^{1}/_{2}$ c.c. vacc. $^{1}/_{15}$. 7 dg. hierna subkutaan ingespoten 3 c. c. vacc. $^{1}/_{15}$. *Herenting: 8 dagen hierna* rug geënt met vaccine: alleen traumat. reactie. 16 dg. na de 2^{e} injectie verbloed uit de Art. carotis.	9 dg. na de enting. 16 „ „ „ „ 4 „ „ „ injectie. 22 „ „ „ enting. 10 „ „ „ 1e injectie. 8 „ „ „ 2e „ 34 „ „ „ enting. 22 „ „ „ 1e injectie. 15 „ „ „ 2e „	positief. } positief. } sterk pos. } sterk pos.
XV.	intraveneus 5 c. c. vacc. $^{1}/_{20}$ in oorvene gespoten. *Herenting: 21 dagen hierna* rug geënt met vaccine: alleen traumatische reactie.	9 dg. na de injectie. 18 „ „ „ „ 20 „ „ „ „ 7 „ „ „ herenting. 4 md. „ „ injectie.	positief. positief. negatief. positief. negatief.
140.	rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven. na 6 dg. mooie vaccineeruptie (dier gedood).	6 dg. na de enting.	positief.
141.	rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven. na 6 dg. mooie vaccineeruptie (dier gedood).	6 dg. na de enting.	zwak pos.
122.	rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine ingewreven. na 5 dg. mooie eruptie die na 17 dg. genezen is. *Herenting: 30 dg. na de eerste enting*, rug herent m. vaccine. Binnen 24 u roodheid (vroegreactie). Verder geen reactie.	7 dg. na de herenting. 12 „ „ „ „ 18 „ „ „ „ 48 „ „ „ „	positief. positief. positief. negatief.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der Complementbindingsreactie.
123.	verloop van enting en herenting als konijn No. 122.	7 dg. na de herenting. 12 " " " " 18 " " " " 48 " " " "	positief. positief. positief. negatief.
XXIII.	rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine behandeld. 15 dg. na de enting verbloed.	22 u. na de enting. 3 dg. " " " 5 " " " " 8 " " " " 15 " " " "	negatief. negatief. negatief. positief. positief.
XXIV.	rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine behandeld.	22 u na de enting. 3 dg. " " " 5 " " " " 8 " " " " 15 " " " " 25 " " " "	negatief. negatief. negatief. positief. positief. negatief.
XXVIII.	intraperitoneaal 5 c. c. vacc. 1/10.	18 u. na de injectie. 4 dg. " " " 6 " " " " 15 " " " " 22 " " " " 35 " " " "	negatief. negatief. zwak pos. zwak pos. negatief. negatief.
XXIX.	intraperitoneaal 5 c.c. vacc. 1/10. 8 dg. daarna intraperitoneaal 5 c. c. vacc. 1/10. 8 dagen hierna overleden. Sectie: peritonitis.	3 dg. na de injectie. 7 " " " " 14 " " " "	negatief. positief. positief.
XXVI.	intraveneus 2 1/2 c.c. vacc. 1/10.	6 dg. na de injectie. 10 " " " " 14 " " " " 18 " " " " 24 " " " "	zwak pos. positief. positief. positief. negatief.
XXVII.	intraveneus 2 1/2 c.c. vacc. 1/10. verbloed voor antigeen onderzoek.	3 dg. na de injectie.	negatief.
XXX.	intraveneus 2 1/2 c.c. vacc. 1/10.	4 dg. na de injectie. 6 " " " " 8 " " " "	negatief. negatief. positief.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der Complementbindingsreactie.
XXXI.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	5 dg. na de injectie. 7 " " " "	negatief. positief.
XXXIII.	intraveneus $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$.	3 dg. na de injectie.	negatief.
XXXIV.	subkutaan 5 c. c. vacc. $^1/_{10}$.	2 dg. na de injectie. 6 " " " " 9 " " " " 14 " " " " 17 " " " " 21 " " " "	negatief. negatief. positief. positief. positief. negatief.
XXXVI.	intraveneus $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$	2 dg. na de injectie. 4 " " " " 6 " " " " 8 " " " "	negatief. negatief. negatief. positief.
XXXVII.	intraveneus $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$.	3 dg. na de injectie. 5 " " " " 6 " " " " 7 " " " "	negatief. negatief. z. zw. pos. positief.

Ik zag dus regelmatig dat er tusschen het vaccineantigeen en het serum der 28 voorbehandelde konijnen eene reactie optrad waarbij complement werd gebonden; eene reactie, die niet of slechts enkele malen, en dan slechts zeer zwak, optrad tusschen het antigeen en het serum van een niet voorbehandeld konijn.

Specificiteit der reactie.

Eene vraag die zich onmiddellijk naar voren dringt is: „is deze reactie te beschouwen als eene *specifieke reactie* tusschen het *vaccineantigeen* en *vaccinale antilichamen* in de konijnensera?"

Daar ik de konijnen had voorbehandeld met vaccine-

lymphe waarin naast het vaccinevirus allerlei vreemde eiwitlichamen (wondsecreet, lymphe, epitheelweefsel en andere weefselresten) te verwachten waren, zou het mogelijk wezen dat de complementbindingsreactie veroorzaakt werd door deze lichamen en de, door deze lichamen, verwekte antistoffen. Ik heb getracht deze mogelijkheid op de volgende wijze uit te sluiten.

Van een kalf, dat volkomen op dezelfde wijze was behandeld als waarop een kalf wordt geënt, met dàt verschil dat na de scarificaties geen lapine- of vaccine-materiaal was ingewreven maar de huid door wrijven met schuurpapier lichtelijk was geïrriteerd, werd den 5^{en} dag na deze behandeling de traumatische eruptie afgekrabd. Deze korsten werden op dezelfde wijze als vaccinekorsten vermalen en met glycerinewater behandeld en van dit materiaal werd op de gebruikelijke wijze een antigeen (*kalverenhuidantigeen*) bereid.

Vervolgens werd de eruptie van een met vaccine geënte konijnenrug afgekrabd en dit materiaal weer met glycerinewater behandeld en hiervan een antigeen (*lapineantigeen*) bereid.

Bovendien werd nog een ander konijn behandeld als het eerste, zonder dat echter den rug met vaccine werd ingewreven na de scarificatie; en de korsten die als traumatische reactie hierop ontstonden, werden verwerkt en tot antigeen (*konijnenhuidantigeen*) gemaakt. Daarnaast werd dan als vierde antigeen op de gewone wijze een *vaccineantigeen* bereid.

Als sera gebruikte ik bij deze proef twee sera die een positieve complementbindingsreactie met het vaccine-antigeen vertoonden; een serum van een voorbehandeld konijn dat eene negatieve complementbindingsreactie gaf en een

serum van een normaal konijn. De *uitslag van deze proef* was dat de beide eerste sera met het vaccine- en het lapine-antigeen eene sterk positieve binding vertoonden, terwijl deze sera met de beide epitheel-antigenen totaal geen binding gaven.

De reactie tusschen de twee andere sera verliep met alle vier de antigenen negatief.

Eene andere mogelijkheid was, dat de reactie te wijten zou zijn aan de reactieproducten op eventueel in de vaccine aanwezige bacteriën en die bacteriën in het antigeen.

Speciaal deze mogelijkheid moest ik nauwkeurig overwegen omdat ik haar nergens in de literatuur vermeld vond en dus ook nergens contrôleproeven in die richting genomen werden.

Het beste ware misschien geweest deze moeilijkheid te omgaan door, voor de antigeenbereiding, uit te gaan van door bacteriënfilters gefiltreerde vaccine.

Het was mij, uit eigen ondervinding, bekend, dat het constant verkrijgen van een beslist steriel, en steriel blijvend, filtraat eigenaardige moeilijkheden oplevert; en daar ik het antigeen altijd versch gebruikte, binnen 24 uur nadat ik het had gemaakt, zou ik dus ook steeds een versch filtraat gehad moeten hebben, en zou telkens wanneer het filtraat bleek niet steriel te zijn (waarvan het onderzoek weer 24 uur in beslag neemt) al mijne moeite tevergeefsch geweest zijn.

Daar komt nog bij dat de vaccinelymphe alvorens te kunnen worden gefiltreerd, op de door NEGRI (35) aangegeven wijze moet worden verdund, en dat het dus wenschelijk ware om het filtraat wederom te concentreeren, volgens de methode, zooals o. a. door VON PROWAZEK (36) en door PAUL (37) wordt aangegeven.

Om door middel van chemische stoffen (chloroform, toluol, aether, kruidnagelessence) te trachten de vaccine-lymphe van eventueel begeleidende kiemen te bevrijden, leek mij, in verband met eene mogelijke eigen haemolytische werking van die stoffen, minder gewenscht.

Op grond van deze overwegingen heb ik gemeend eerst te moeten uitmaken in hoeverre de boven uitgesproken veronderstelling juist bleek te zijn. Mocht het blijken dat de bacteriën en hunne reactieproducten inderdaad eene rol bij de reactie speelden dan lag nog altijd de weg voor mij open om als antigeen gefiltreerde geconcentreerde vaccine-lymphe te gebruiken.

Eenige malen werden door mij verschillende buisjes met agar geënt met de vaccine, die ik bij de voorbehandeling der konijnen gebruikte. Als uitzondering groeiden dan op sommigen dezer, enkele witte kolonietjes, die bij onderzoek staphylococcen bleken. (Ik mocht hieruit afleiden dat ik met vaccine werkte met een betrekkelijk laag bacteriëngehalte). De culturen werden met 1 cM^3. physiologische zoutoplossing afgeschud en in verdunning $^1/_5$ als antigeen gebruikt. Tusschen dit *bacteriënantigeen* en verschillende onderzochte sera zag ik *nooit* complementbinding optreden, zoodat ik heb gemeend dat ik mocht blijven werken met het antigeen waarvan ik op blz. 34 de bereiding beschreef.

Ten slotte dient hier vermeld, dat ik door het resultaat mijner onderzoekingen nog eene andere mogelijkheid voor fouten op het spoor kwam. Daar ik hierop niet vooruit wil loopen, zal ik dit punt aan het einde van dit hoofdstuk nader bespreken.

In verband met bovengenoemde contrôleproeven, meen ik te mogen besluiten dat *de complementbindingsreactie*

tusschen het vaccineantigeen en het serum van met vaccine voorbehandelde konijnen is op te vatten als eene *specifieke reactie tusschen vaccine-antigeen en vaccinale antilichamen.*

Deze reactie treedt betrekkelijk snel na de voorbehandeling op en verdwijnt spoedig daarna.

Hierin stemmen mijne resultaten dus met die van HALLWACHS (28), GASTINEL (7) en anderen, overeen.

Ik vond de reactie:

a. bij *kutaan* geënte konijnen, (Nos I, V, VI, VII, XIII, 140, 141, 122, 123, XXIII en XXIV) vanaf den *6den* tot aan den *18den* dag na de enting.

b. bij *intraveneus* geënte konijnen (Nos III, IV, IX, X, XV, XXVI, XXX, XXXI, XXXVI en XXXVII) vanaf den *7den* tot aan den *19den* dag na de injectie.

c. bij *subkutaan* geënte konijnen (Nos II, VIII en XXXIV) vanaf den *7den* tot aan den *17den* dag na de injectie.

d. bij *intraperitoneaal* geënte konijnen (Nos XII, XXVIII, XXIX) vanaf den *6den* tot aan den *16den* dag na de injectie.

Ik vond dus, dat na een gegeven moment, de complementbindende antistoffen niet meer in het serum waren aan te toonen en nu deed zich de vraag voor of misschien deze stoffen, nadat zij uit het serum verdwenen waren, nog elders in het organisme waren te vinden.

Compl. bindende antistoffen in organen.

Van de organen onderzocht ik: de lever, de milt, de nieren, het beenmerg, de long, het hart en het slijmvlies van pharynx en trachea. Verder de huid en het bloed als zoodanig. Het darmslijmvlies bleek niet geschikt voor een dergelijk onderzoek daar het extract daaruit op zichzelf sterk haemolytisch werkte.

Het dier werd door verbloeding uit de art. carotis gedood; de dieren, waarvan ik alleen de huid onderzocht, behoefde ik echter niet te dooden, maar sneed, na den rug geknipt en zorgvuldig geschoren te hebben, een ellipsvormig stuk uit de rughuid, ter lengte van 7 à 8 cM. en ter breedte van ongeveer $2^1/_2$ cM., en hechtte de wond met geknoopte hechtingen. Aldus te werk gaande, kon ik bij hetzelfde konijn tot driemaal toe stukjes huid nemen en aldus het proces in de huid vervolgen.

Organen en huid werden fijngeknipt en in den mortier zeer zorgvuldig fijngewreven. Bij één gewichtsdeel van dit papje werden vier deelen van een $^5/_{1000}$ oplossing van carbol in 0,85 % keukenzout-oplossing gevoegd en dit werd 24 uur in een schudapparaat te schudden gezet. Daarna werd de vloeistof door een vouwfiltertje gefiltreerd en aldus kwam de vloeistof als orgaanextract in behandeling. De extracten werden steeds onmiddellijk na de bereiding voor de proef gebruikt, daar het eigen complementbindend vermogen zeer snel bleek toe te nemen.

Het bloed leverde eene eigenaardige moeilijkheid op, daar ik de stolling wilde voorkomen. Ik begon met 1 $cM.^3$ bloed op te vangen in 1 $cM.^3$ $1^1/_2$ % citr. natr. oplossing waarbij geen stolling optrad. Hiervan werd 1 $cM.^3$ genomen en daarbij gevoegd 4 $cM.^3$ 0,85 % keukenzoutoplossing.

Nu bleek echter bij de eerste, met deze vloeistof genomen proef, dat de reactie niet af te lezen was, door de aanwezigheid van roode konijnenbloedlichaampjes. Om aan dit bezwaar te ontkomen ben ik op de volgende manier te werk gegaan.

Bij 6 $cM.^3$ steriel aq. dest. werd 1 $cM.^3$ door het slaan

met een glazen staaf, goed gedefibrineerd bloed gevoegd. Wanneer deze vloeistof een half uur had gestaan was er complete haemolyse opgetreden. Dan werd toegevoegd 3 c. c. keukenzoutoplossing van 2,55 % zoodat ten slotte eene oplossing van 1 cM.³ bloed in 9 cM.³ zout van 0,85% werd verkregen. De roode kleur hiervan bleek geen bezwaar voor het aflezen der reactie.

Alvorens nu met de orgaanextracten en met het bloed de complementbindingsreactie te kunnen verrichten, moest eerst weer het eigen bindend vermogen en eventueele eigen haemolytische eigenschappen nauwkeurig worden nagegaan.

Ik deed dit volgens het volgende schema:

Titratie der orgaan-extracten.

	Zoutopl. 0,85 %.	Orgaan-extract.	Complement (in gevonden verdunning).		Amboceptor (in gevonden verdunning).	5 % Chromoc. opl.
1	0	1/10 0,5	0,25	Verblijf van 1 uur in waterbad 37° C.	0,25	0,25
2	0,15	0,35	0,25		0,25	0,25
3	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,35	0,15	0,25		0,25	0,25
5	0	1/50 0,5	0,25		0,25	0,25
6	0,15	0,35	0,25		0,25	0,25
7	0,25	0,52	0,25		0,25	0,25
8	0,35	0,15	0,25		0,25	0,25
9	0	1/250 0,5	0,25		0,25	0,25
10	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
					Zoutopl. 0,85 %.	
1	0	1/10 0,5	0,25		0,25	0,25
2	0,15	0,35	0,25		0,25	0,25
3	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,35	0,15	0,25		0,25	0,25
5	0,5	0	0,25		0,25	0,25

En bovendien enkele malen:

	0,85 % Zoutopl.	Orgaan-extract.	Amboceptor (in gevonden verdunning).	5 % chrom.opl.
1	0	1/10 0,5	0,25	0,25
2	0,15	0,35	0,25	0,25
3	0,25	0,25	0,25	0,25
4	0,35	0,15	0,25	0,25
5	0,5	0	0,25	0,25

Uit deze titraties, die ik weer voor *elke* proef geregeld verrichtte was dus af te lezen:

1° *het eigen bindend vermogen.* Dit bleek niet sterk te zijn. Met uitzondering van enkele lever- en miltextracten, die, waarschijnlijk door hun bloedrijkdom, sterker remden, bleek in het eerste buisje, waarin dus 0,5 cM³. van het orgaanextract 1/10, geregeld complete haemolyse opgetreden te zijn; indien de haemolyse hierin bijna compleet was, bleek in het tweede buisje de haemolyse compleet te zijn. Hierbij dient opgemerkt dat ik de extracten steeds versch gebruikte.

2° *het eigen haemolytisch vermogen* der extracten, en

3° eene mogelijke *aanwezigheid* in het extract van eene belangrijke hoeveelheid *complement.* Geen dezer twee eigenschappen vond ik bij de onderzochte orgaanextracten.

Voor de eigenlijke proef werd volgens het op blz. 41 gegeven schema telkens ingezet 0,3 en 0,1 van het vaccine-antigeen met 0,25 van het orgaanextract in de gevonden verdunning. **Eigenlijke proef.**

De resultaten der verrichte reacties wil ik in de volgende tabel beschrijven:

TABEL II.

Konijn	Wijze van voorbehandeling en opmerkingen.	Tijd van de proef.	Resultaat der Complementbindingsreactie.	
XV.	4 maanden na de intraveneuze injectie van 5 c.c. vacc. $^1/_{20}$ door verbloeden gedood.	4 mnd. na de injectie.	bloed. leverextr. nierextr. beenmergextr. *huidextr.* miltextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XIX.	3 maanden na de intraveneuze injectie van 5 c.c. vacc. $^1/_{20}$ door verbloeden gedood.	3 mnd. na de injectie.	bloed. leverextr. nierextr. beenmergextr. *huidextr.* miltextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXII.	Volkom. gezond konijn.		*huidextr.*	*negatief.*
XVII.	$3^1/_2$ maand na de intraveneuze injectie van $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{15}$ door verbloeden gedood.	$3^1/_2$ mnd. na de injectie.	*huidextr.*	*positief.*
XXVIII.	Intraperitoneaal 5 c. c. vacc. $^1/_{10}$.	6 dg. na de injectie. 35 „ „ „ „	*huidextr.* bloed. longextr. miltextr. *huidextr.* extr. van pharynx- en trachea slijmvlies.	*zwak pos.* negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXIX.	Intraperitoneaal 5 c c. $^1/_{10}$ vacc.	70 u. na de injectie. 7 dg. „ „ „	*huidextr.* *huidextr.*	*negatief.* *positief.*

Konijn	Wijze van voorbehandeling en opmerkingen.	Tijd van de proef.	Resultaat der Complementbindingsreactie.	
XXIII.	Rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine behandeld.	15 dg. na de enting.	bloed. hartextr. longextr. leverextr. nierextr. *huidextr.* miltextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXIV.	Rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine geënt.	25 dg. na de enting.	bloed. hartextr. longextr. leverextr. miltextr. nierextr. *huidextr.*	negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.*
XXVI.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$.	6 dg. na de injectie. 7 " " " "	*huidextr.* *huidextr.*	*positief.* *positief.*
XXVII.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$.	3 dg. na de injectie.	bloed. hartextr. miltextr. leverextr. *huidextr.* longextr. nierextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. *negatief.* negatief. negatief.
XXXIII.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$.	3 dg. na de injectie.	leverextr. miltextr. nierextr. tracheaal-slijmvlies-extr. longextr. hartextr. *huidextr.*	negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *zeer zwak positief.*
XXXIV.	Subkut. 5 c. c. vacc. $^1/_{10}$.	24 dg. na de enting.	bloed. miltextr. longextr. pharynx- en tr. slijmvliesextr. beenmerg. hartextr. *huidextr.*	negaief. negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.*

Conclusies. Het valt dadelijk op, dat *waar in geen enkel der andere onderzochte organen noch in het bloed complementbindende stoffen konden worden aangetoond, deze in de huidextracten regelmatig werden aangetroffen* [1]).

Het huidextract van een met vaccine voorbehandeld dier gaf, zelfs tot 4 maanden na die voorbehandeling, eene positieve complementbindingsreactie met het vaccine-antigeen.

Het huidextract van een gezond, onvoorbehandeld konijn (waarvan ik alleen n⁰. XXII in de tabel vermeld, maar er vier onderzocht) gaf *nooit* eene positieve reactie.

Kort samenvattend verliep dus de reactie:

4 maanden na de voorbehandeling	:	organen [2]) —;	huid +.
3½ maand „ „ „	:		huid +.
3 maanden „ „ „	:	organen —;	huid +.
35 dagen „ „ „	:	organen —;	huid +.
25 „ „ „ „	:	organen —;	huid +.
24 „ „ „ „	:	organen —;	huid +.
15 „ „ „ „	:	organen —;	huid +.

[1]) Het feit dat door mij antistoffen in de huid gevonden werden, bracht mij voor eene moeilijkheid, die hier met een enkel woord moet worden vermeld. Immers bestond de mogelijkheid dat er in de vaccinelymphe die ik bij de voorbehandeling van de konijnen en de bereiding van het antigeen gebruikte, antilichamen aanwezig waren en dat er als reactieproducten daarop, naast antilichamen bovendien nog anti-antilichamen ontstonden, die met de antilichamen van het antigeen complement bonden. Nu is het bestaan van dergelijke anti-antilichamen hypothetisch, dus daarom wil ik op de mogelijkheid niet diep ingaan. Maar, wanneer wij zien, dat bij de samenvoeging van het antigeen (dat 70 % vaccine-puisten bij het kind geeft en dat in staat is actief te immuniseeren, waarin dus het virus zal overheerschen boven mogelijk aanwezige antistoffen) en het immuunserum (waarin de antistoffen zullen overheerschen boven mogelijk aanwezige anti-antistoffen) complement gebonden wordt, terwijl antigeen en immuunserum *ieder voor zich geen complement binden*, is het zeker niet voor de hand liggend om dan aan te nemen dat deze binding aan eene antilichaam-antiantilichaamreactie moet worden toegeschreven.

[2]) Waaronder ook het bloed.

7 dagen na de voorbehandeling:		huid +.
6 „ „ „ „ :		huid zw. +. huid +.
3 „ „ „ „ :	organen —;	huid —. huid +.
70 uur „ „ „ :		huid —.

Deze resultaten, en speciaal ook het feit dat, in één geval, drie dagen na de voorbehandeling, in de huid reeds complementbindende stoffen aan te toonen waren, wekten op tot nader onderzoek en wezen in eene speciale richting.

Maar alvorens te beschrijven waarheen deze richting mij voerde, wil ik eerst uiteen gaan zetten hoe, en op welke plaatsen ik het vaccine virus, in den vorm van antigeen, in het konijnenorganisme heb aangetoond.

LITERATUUR.

1. Tanaka. Zur Erforschung der Immunität durch die Vaccination. Centr. Bl. f. Bakt. Bd 32. 1902.

2. Freyer. Das Immunserum der Kuhpockenlymphe. Centr. Bl. f. Bakt. Bd 36. 1904.

3. Straus, Chambon et Ménard. Recherches expérimentales sur la vaccine chez le veau. Soc. de Biol. 1890.

4. Béclère, Chambon et Ménard. Etudes sur l'immunité vaccinale et le pouvoir immunisant du serum de génisse vaccinée. Annal. de l'Inst. Past. Tome 10. 1896.

5. Camus. Recherches sur l'immunité vaccinale passive et sur la sérothérapie. Journ. de Phys. et de Path. génerale. 1912.

6. Henseval et Convent. Recherches sur l'immunité vaccinale Etude des propriétés du sérum des animaux vaccinés. Revue internat. de la vacc. Tome 3. 1912—1913.

7. Gastinel. Des réactions d'infection et d'immunité dans la vaccine et la variola. Thèse de Paris 1913.

8. Teissier et P. L. Marie. Essais de sérothérapie variolique. Comptes rendus de l'Acad. d. sciences 155. 1912. (Ref. Journ. de Phys. et de Path. gén. 1913).

9. Béclère, Chambon et Ménard. Etudes sur l'immunité vaccinale. 2e et 3e Mémoire. Ann. de l'Inst. Past. Tomes 12 et 13. 1898 et 1899.

10. Sternberg. Wissenschaftliche Untersuchungen über das spezifische Infektionsagens der Blattern und die Erzeugung künstlicher Immunität gegen diese Krankheit. Centr. Bl. f. Bakt. Bd 19. 1896.

11. Camus. Recherches sur l'immunité vaccinale. De l'action antivirulente des humeurs des animaux vaccinés, ses variations, ses relations avec l'action bactéricide. Journ. de Phys. et de Path. générale. Tome 10. 1908.

12. Camus. Des variations do l'aotivité antivirulente des humeurs et de l'immunité des tissus choz les animaux vaccinés. Journ. do Phys. et de Path. géuerale. Tomo XI. 1909.

13. Halberstädter und Von Prowazok. Experimontolle Untersuchungon über die Vaccine dor Affon. Arbeiton aus dem kaiserl. Gesundheitsamte. Bd 37. 1911.

14. Von Prowazok und Beaurepairo Aragâo. Untorsuchungen über die Variola. Münchn. med. Woch.schr. 1908.

15. Teissier et Gastinol. Les réactions humorales dans la vaccine humaino ou expérimentale et dans la variole. Compt. rend. de l'Acad. d. sciences. 155. 1912. (Ref. Journ. de Phys. et de Path. génér. 1914.)

16. Süpfle. Leitfaden der Vaccinationslehre. 1910.

17. Jobling. The occurence of specific immunity principles in the blood of vaccinated calves. Studies of the Rockefeller Institute for Medical Research. Vol. 6. 1907.

18. Heller und Tomarkin. Ist die Methode der Komplementbindung beim Nachweis spezifischer Stoffe für Hundswut und Vaccine brauchbar? Deutsche med. Woch.schr. 1907.

19. Beintker. Ueber das Verhalten der Bordet'schen Reaktion bei Variola. Centr.bl. f. Bakt. Bd 48. 1908.

20. Bermbach. Untersuchungen über den Impfschutz mittels der Bordet'schen Reaktion. Centr. bl. f. Bakt. Bd 49. 1909.

21. Sugai. Uber den Komplementbindungsversuch bei Variola vera. Centr. bl. f. Bakt. Bd 49. 1909.

22. Dahm. Serologische Untersuchungen bei der Variola vera. Centr. bl. f. Bakt. Bd 51. 1909.

23. Xylander. Die Komplementbindungsreaktion bei Syphilis, Impf. — pocken und anderen Infektionskrankheiten. Centr. bl. f. Bakt. Bd. 51. 1909.

24. Kryloff. Ueber die Komplementbindungsreaktion bei der Variolois und der Variola vera. Centr. bl. f. Bakt. Bd 60. 1911.

25. Casagrandi. Annali del l'instituto d'igiene sperimentale. Bd. 17. 1907 en Bd. 19. 1909. (geciteerd naar Gastinel.)

26. Casagrandi. Il policlinico. (Practica). deel 13. 1908. (als boven.)

27. Paschen. Ueber Immunitätsverhältnisse bei Variola-vaccine. Handb. v. Kraus und Levaditi Erster Ergänzungsband. 1911.

28. Hallwachs. Ueber Komplementbindungsversuche mit dem Serum lapinisierter Kaninchen. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd 69. 1911.

29. Shiga und Kii. Experimentelle Studien über die Variola-immunität. Festschr. z. 25-jähr. Prof. Jubiläum d. Prof. Ogata. 1910. (Ref. Zeitschr. f. Immun-forsch. Ref. 1910).

30. Klein. Komplementbindung bei Variola. Münchn. mediz. Woch. schr. 1914. n⁰. 47.

31. von Kouschegg. Komplementbindung bei Variola. Wiener klin. Wochenschrift. 1915. n⁰. 17.

32. Calmette et Guérin. Recherches sur la vaccine expérimentale. Ann. de l'Inst. Past. Tome 15. 1901.

33. Armand-Delille Techniques du diagnostic par la méthode de déviation du complément. 1911.

34. Kapsenberg. Twee mededeelingen betreffende de techniek der reactie van Wassermann. Ned. Tijdschr. voor Geneeskunde. 1913. tweede helft n⁰. 13.

35. Negri. Ueber Filtration des Vakzinevirus. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 54. 1906.

36. von Prowazek. Weitere Untersuchungen über das Vaccinevirus. Centr. Bl. f. Bakt. Bd 72. 1914.

37. Paul. Ueber Aufschlieszung, Isolierung, und Einengung von reinem vakzinalen Virus aus tierischen Schutzblattern auf mechanischem Wege. Deutsche med. Woch.schr. Bd. 44. 1913.

HOOFDSTUK III.

Over het al dan niet circuleeren van het vaccine-virus in den bloedbaan.

De vraag, waar het virus, na plaatselijk te zijn ingebracht, blijft, is voor het immuniteitsvraagstuk der vaccine van groot belang; en juist het feit dat de meeste onderzoekers het virus niet in de circulatie en in orgaanextracten konden aantoonen is een grooten steun voor de opvatting dat de vaccine-immuniteit eene lokale zou zijn. (Zie Hoofdstuk I.) Alle onderzoekingen, die in verband met deze vraag zijn gedaan, zijn verricht door middel van het *dier-experiment*; stellen zich dus ten doel levend virus aan te toonen. Men heeft dus òf getracht door enting der konijnen-cornea lichaampjes van Guarnieri in het cornea-epitheel te verwekken òf men heeft de enting op kalf of konijnenrug uitgevoerd.

Wat de *corneaproef* betreft (1) [1]: deze methode is objectief, maar schijnt niet zeer gevoelig.

Noguchi (2), die mogelijk ook voor dit vraagstuk nieuwe banen opent door te bewijzen dat het vaccinevirus in vivo (konijnentestikel) cultiveerbaar is, beschrijft dat hij met eene emulsie van met vaccine ingespoten konijnen-testikel slechts in verdunning tot $^1/_{300}$ eene positieve corneale enting verkrijgt. Diezelfde emulsie echter geeft nog in verdunning $^1/_{1000}$ eene vaccinale huideruptie. De *huidenting*

---

[1]) Literatuur aan het slot van dit Hoofdstuk.

blijkt dus gevoeliger dan de corneaenting, maar nu is de beoordeeling van het resultaat van eene dergelijke huidenting op den konijnenrug vaak uiterst moeilijk [1]) en zullen de uitkomsten van een dergelijk onderzoek dus onder den invloed staan van eenen sterken persoonlijken factor.

Bovendien bestaat dan altijd nog eene bron voor foutieve waarnemingen in het feit, dat men in hetzelfde laboratorium werkt met vaccine en met op vaccine te onderzoeken materiaal. De gevaren die hier dreigen heeft DUVOIR (3) experimenteel in zijne dissertatie aangetoond en hij formuleert zijne conclusie aldus: „Les inoculations à blanc pratiquées à l'académie de Médecine, ont prouvé la facilité des contaminations vaccinales accidentelles, et, par suite, diminué la portée des expériences réalisées dans les Instituts vaccinogènes."

Het is opvallend dat de allereerste in deze richting genomen proeven er al duidelijk op wijzen dat het dierexperiment voor de beantwoording van dit vraagstuk eigenaardige moeilijkheden oplevert. Immers M. RAYNAUD (4) kwam in 1877 op grond zijner onderzoekingen (transfusie van bloed van geënt kalf bij normaal kalf) tot de conclusie dat het bloed onder gegeven omstandigheden als een „très puissant véhicule du virus vaccinal" moest worden beschouwd; maar in het volgende jaar gaf RAYNAUD (5) zelf toe dat hij niet genoeg had gewaakt tegen „inoculations accidentelles". Hij herhaalde zijne onderzoekingen en moest zijne bevindingen herroepen.

---

[1]) In geval eener twijfelachtige eruptie zal vaak alleen het overenten van het, van een dergelijke eruptie verkregen, materiaal op het kalf, de beslissing kunnen brengen.

Het kan ons dan ook niet verbazen, dat de, door de verschillende onderzoekers medegedeelde uitkomsten, verkregen bij het zoeken naar levend virus door dierenting, elkaar telkens weer tegenspreken.

Zonder over deze onderzoekingen een volledig overzicht uit de literatuur te willen geven, meen ik toch enkele der voornaamsten te moeten mededeelen.

Oppervlakkig beschouwd schijnt Eichhorn al in 1829 het circuleeren van het virus in het bloed te hebben aangetoond.

Hij zag secundair ontstane pokpuisten optreden bij kinderen die 5 dagen na de eerste inenting met een „schoon lancet" gescarificeerd waren. Nobl (6) trachtte dit experiment te herhalen maar hij maakte de scarificaties pas 10 tot 20 dagen na de eerste enting. Hij kreeg negatieve resultaten.

Eene andere herhaling dezer proeven kon ik in de literatuur nergens vinden; maar de proeven van Eichhorn mogen nù, waar wij de groote resistentie van het vaccinevirus tegenover uitdroging en de werkzaamheid van het virus ook nog in sterke verdunning kennen, wel niet als bewijzend worden aangevoerd, daar toch het begrip „schoon lancet" van den jare 1829 nu wel een vaag begrip mag genoemd worden.

In 1872 entte Reiter (7) met bloed van een 8 dagen te voren gevaccineerd kind op de oppervlakte van eene bij een kind getrokken blaar. Hij zag, op den 8sten dag nadien, op die plaats mooie puisten te voorschijn komen.

Ook L. Pfeiffer (8) kon met goed gevolg het bloed van geënte kinderen op groote entvlakten enten.

Nog anderen spreken zich, op grond van hunne experimenten uit vóór een circuleeren van het virus.

Zoo vond SIEGEL (9), entend met het filtraat van bloed en orgaanextracten, bij één van de drie proefdieren Guarnieri'sche lichaampjes in de cornea. VON WASIELEWSKI (10) kreeg ook een positief resultaat, entend met nierextract.

Van den lateren tijd wil ik speciaal nog de onderzoekingen van CASAGRANDI vermelden zooals ik die bij PASCHEN (11) beschreven vond [1]).

CASAGRANDI entte 10 cM.^{3} geconcentreerd filtraat van een 6 dagen oude vaccine op de geschoren rughuid. Op den 10^{en} dag werd het dier gedood. Entingen op huid en cornea met het geconcentreerde filtraat van het bloed verliepen negatief; positief daarentegen de enting van milt- en nierextract op huid en cornea. Ook met milt-, beenmerg- en nierextract van op andere wijze met vaccine voorbehandelde konijnen kreeg hij een positief resultaat, terwijl entingen met het bloed van deze dieren een negatief resultaat opleverden.

Op grond dezer proeven besluit CASAGRANDI dat het virus ook in de inwendige organen, met name in milt, nier en beenmerg, aanwezig is.

Later verrichtte CASAGRANDI dergelijke onderzoekingen bij kippen (12) en vond regelmatig bij kutaan, subkutaan en intraveneus met vaccine voorbehandelde kippen het virus na verscheidene weken nog in het bloed (met name in de leucocyten) en in de organen (voornamelijk in hart, nier en long). *Aan het einde van dit hoofdstuk hoop ik nader op dit onderzoek terug te komen.*

SION en RADULESCO (13) vonden een in de circulatie komen zeer frequent bij jonge konijnen. Zij vonden het

---

1) Het mocht mij niet meer gelukken het oorspronkelijke artikel uit Turijn in handen te krijgen.

virus in milt, beenmerg, verschillende lymphklieren, en speciaal ook in het kamervocht. Dit laatste is door CAMUS (14) weder beslist tegengesproken.

ALDERSHOFF (1) vermeldt de observatie, dat hij met het nierextract van een konijn, dat 24 uur na de intraperitoneale injectie met vaccine, gedood was, lichaampjes van Guarnieri in de cornea kon opwekken.

VAN DER KAMP (15) schoor den rug van een konijn waarbij hij 24 uur te voren 500 c.M³. vaccinefiltraat subkutaan had ingespoten en zag eenige dagen hierna eene vaccinale eruptie optreden. Hij leidt hieruit af dat het filtraat werkzaam virus bevat dat in de bloedbaan circuleert.

Hiertegenover staan zeer talrijke onderzoekingen die trachten te bewijzen dat het virus *niet* in de circulatie overgaat.

PASCHEN (11) o. a kon geen enkel positief resultaat verkrijgen door enting op de cornea van fijngewreven materiaal van milt en andere organen van 5—6 dagen te voren geënte kalveren.

Zoo vermelden ook VON .PROWAZEK (16), HAUSER (17), JÜRGENS (18), OHLY (19), HAALAND (20) en SÜPFLE (21) negatieve resultaten bij entproeven met bloed en orgaanextracten van het gevaccineerde konijn.

In deze reeks onderzoekingen nemen die van CALMETTE en GUÉRIN en VON PROWAZEK en YAMAMOTO eene eigenaardige plaats in en dienen daarom nader beschreven te worden.

CALMETTE en GUÉRIN (22) zagen dat, wanneer zij de vaccine intraveneus bij het konijn inbrachten er nooit spontane erupties op de slijmvliezen optraden, zooals CHAUVEAU (23) die o. a. na inspuiting van vaccine in een lymphevat bij het paard beschreven had. Wanneer zij echter binnen de

eerste 24 uren volgend op de intraveneuze injectie, het dier den rug schoren, zagen zij den 3^{en} dag nadien, op de geschoren huid karakteristieke pokpuisten optreden, terwijl geen enkele puist zich op eenige andere plek ontwikkelde. Wanneer zij hetzelfde experiment, 48 uur, 3 dagen en 4 dagen na de intraveneuze toediening verrichtten, dan ontwikkelde zich geen enkele vaccinepuist. Zij concludeerden hieruit dat de virulente elementen van de vaccine de eerste 24 uren in de circulatie blijven.

Entingen op de geschoren konijnenhuid met gedefibrineerd bloed, 24 uur, 48 uur en later na de intraveneuze injectie afgenomen, bleven allen negatief.

Op eene andere wijze gingen VON PROWAZEK en YAMAMOTO (24) deze proeven na. Zij spoten $2^1/_2$ c.M^3. vaccine $^1/_{30}$ intraveneus bij konijnen in. Op verschillende tijden werden dan de lidranden en de cornea gescarificeerd zoodat het uittredende bloed gelegenheid had de vaatlooze cornea te infecteeren. Aldus handelend, constateerden zij dat het virus zich maar 1 uur in de bloedbaan staande houdt. De oorzaak van dit verdwijnen uit de bloedbaan mag echter niet gezocht worden in een gedood worden van het virus door het bloed; want, wanneer de onderzoekers dadelijk na de injectie, bloed uit de oorvene namen, dit defibrineerden en in de ijskast plaatsten, bleek dit bloed in de eerste 24 uur nog in staat Guarnieri'sche lichaampjes op de konijnencornea te veroorzaken, m. a. w. bleek dus nog virushoudend.

Op grond ook van verdere onderzoekingen besluiten VON PROWAZEK en YAMAMOTO „dat het virus in het bloed slechts een uur na de intraveneuze injectie voorkomt; dat het in het beenmerg, de lever en de milt nog 2 uren, in de intraperitoneaalholte nog 4 uren daarna is aan te toonen, dat

de phagocyten het hoofdzakelijk in zich opnemen en dat er in het konijnenorganisme geen ontwikkeling van het vaccinevirus plaats heeft, met uitzondering van in de huidbekleeding."

Zij vonden in de proeven van CALMETTE en GUÉRIN, die zij met positieven uitslag herhaalden. eene aanleiding om in verband met hun eigen proeven te besluiten, dat het slechts één uur in de circulatie blijvende vaccinevirus, zich in de huid nestelt en daar nog 2 dagen blijft leven en zijne virulentie behoudt — maar niet in staat is zonder opening van de huidbekleeding eene eruptie te voorschijn te roepen.

VON PROWAZEK kon met het epitheel, dat 24 uur na de intraveneuze injectie was afgekrabd, géén vaccinale reactie verkrijgen.

In den laatsten tijd heeft men getracht in eene vloeistof waarin waarschijnlijk eene kleine hoeveelheid vaccinevirus aanwezig is, deze hoeveelheid te concentreeren.

Zoo beschrijft HAMMERSCHMIDT (25) het gebruik van dierlijke kool waarmede de vloeistof geschud wordt en die door centrifugeeren wordt afgescheiden. Deze „koolvaccine" zou zoowel in verschen toestand werkzaam zijn als na te zijn gedroogd. Volgens deze methode onderzocht HAMMERSCHMIDT of in de orgaanextracten van konijnen, 8—10 dagen na eene intraveneuze injectie met vaccine, nog virus aan te toonen was.

Entingsproeven hiermede bleven alle zonder gevolg.

Op grond van bovengenoemde onderzoekingen meen ik te mogen zeggen, dat een doorslaand bewijs voor het in de circulatie blijven van het *vaccinevirus* nog niet gegeven is.

Dit moet opvallen, wanneer wij weten dat bij de *variola*

een circuleeren van het virus in het bloed gedurende eenigen tijd der ziekte wordt aangenomen en het wetenschappelijk bewijs daarvan geleverd schijnt. Zoo konden Zülzer (26) en Roger en Weil (27) apen infecteeren door enting met bloed van variolalijders. Von Prowazek en de Beaurepaire Aragão (28) beschrijven, naast entingen met twijfelachtig of negatief resultaat, dat zij door leverextract van een foetus, wiens moeder aan variola confluens was gestorven, op de konijnencornea te enten, lichaampjes van Guarnieri in die cornea konden verwekken. Ook met bloed entend kregen zij enkele duidelijk positieve resultaten. Nu zijn, dunkt mij, ook bij een dergelijk onderzoek, fouten heel moeilijk te omgaan. Ik stel mij ten minste voor, dat het opvangen van bloed bij een variolalijder zonder kans op toevallige infectie van het materiaal met variolavirus uiterst moeilijk is.

Het verschillend gedrag van het vaccine- en variolavirus in het organisme tracht Süpfle (21) te verklaren door aan te nemen dat de neiging tot vermeerdering van den variola-verwekker grooter is dan die van het vaccinevirus. Toch kan dunkt mij door deze opvatting het bovengenoemde verschil niet logisch worden verklaard.

Bovendien mogen wij in dit verband de gevallen van *vaccina generalisata* niet uit het oog verliezen, al mogen deze dan niet bijzonder veel voorkomen.

Zoo beschrijven Hill en Ross (29) eene epidemie van vaccine in Natal, waarbij in 20 % der gevallen generalisatie optrad. En al ligt het misschien voor de hand in dergelijke gevallen te denken aan autoinfectie door krabben of mogelijk ook aan een overbrengen van het virus door insecten, toch mag men de mogelijkheid van transport langs de bloedbaan in zulke gevallen niet uitsluiten. *Tegen* het bestaan van

een dergelijk transport voert SÜPFLE (30) als ervaringsfeit (n. b. „impfärztliche Erfahrung"!) aan, dat men kinderen lijdende aan eczeem kan inenten, zonder angst voor complicaties, indien men de plaatsen waar het eczeem zich bevindt, maar zeer zorgvuldig verbindt. Mijns inziens is het neerschrijven van eene dergelijke uitspraak door een op dit gebied zoo gezaghebbend man als SÜPFLE, niet te verantwoorden. Veel liever schaar ik mij aan de zijde van MERENS (31), die met nadruk waarschuwt tegen het inenten van eczemateuze kinderen; en ik wil hier herinneren aan het geval beschreven door BLOCHMANN (32), wiens eczemateus zoontje na toevallige vaccine-infectie een oog verloor.

Wel zou ik twee eigen observaties mede willen deelen, die tegen een circuleeren in het bloed van het vaccine-virus bij gevaccineerde kinderen pleiten kunnen.

De eene betreft een kind dat des morgens ingeënt, (de plaats van enting was met een gaasje verbonden) den middag van dienzelfden dag komt te vallen en daarbij vrij uitgebreid de dij openschaaft (dus a. h. w. een analogon van de proef van CALMETTE en GUÉRIN). Na 7 dagen zag ik het kind ter contrôle terug en zag toen tevens voor de eerste maal de schaafwond die bezig was onder de droge korst te genezen. Bij navraag bleek geenerlei antisepticum daarop toegepast te zijn.

Bij het tweede kind waren op den avond van den dag waarop het kind was ingeënt, 2 brandblaren ter grootte van ongeveer een gulden ontstaan door het branden met kokende melk. Ook dit kind zag ik eerst den 7[en] dag, toen de blaren open waren en de moeder er een droog lapje om gedaan had.

In geen dezer beide gevallen dus het optreden van het eezema vaccinatum. Toch blijft nog de mogelijkheid dat de geringe hoeveelheid virus die bij de enting het organisme binnendringt niet in staat is zich, zelfs in de gelaedeerde huid te manifesteeren.

Voordeelen der complementbindingsmethode boven het dierexperiment.

Zooals in den aanvang van dit hoofdstuk door mij werd aangevoerd, lijkt mij het dierexperiment bij vaccineproeven in principe niet het meest geschikte. Met name geldt dit voor het aantoonen van levend virus door dierenting, waarbij toch toevallige infecties steeds weer dreigen. Ik heb mij daarom de vraag gesteld of deze moeilijkheid niet was te omgaan en ik meen in de *complementbindingsmethode* eene methode gevonden te hebben, waarbij zich veel minder dergelijke toevalligheden kunnen voordoen en bovendien heeft deze methode dan nog het in Hoofdstuk I besproken voordeel, dat daarmede in het algemeen gesproken, *antigeen* kan worden aangetoond, zonder dat dit *levend virus* behoeft te zijn; terwijl het dierexperiment alleen antwoord kan geven op de vraag of er levend virus in het te onderzoeken materiaal aanwezig is. Naast de complementbindingsmethode zouden mogelijk nog andere methoden voor de oplossing van dit vraagstuk kunnen worden toegepast. Hiervan zou ik b.v willen noemen de bestudeering eener allergische of mogelijk anaphylactische reactie die voorbehandelde dieren bij herinjectie misschien zouden kunnen vertoonen.

Maar waar ook bij deze proeven zich de bezwaren van het dierexperiment kunnen doen gevoelen en bij de beoordeeling van dergelijke reacties ook de persoonlijke opvatting van den onderzoeker weer eene rol speelt, heb ik gemeend

de complementbindingsmethode te moeten volgen, en heb dus getracht met behulp van de *complementbindingsreactie* antigeen aan te toonen in het serum van voorbehandelde konijnen, op verschillende tijden na die voorbehandeling.

Aantoonen van antigeen in het serum door middel der complementbindingsreactie.

Ik ging dus bij elkaar voegen:

1. serum waarin mogelijk antigeen.
2. serum waarin zeker antistoffen.
3. complement.

Op antigeen te onderzoeken serum.

Ad 1. De eerste moeilijkheid die zich voordeed was de aanwezigheid van complement in dit serum. Oppervlakkig beschouwd lijkt deze moeilijkheid niet groot, daar er toch verschillende methoden (33) bekend zijn om eene vloeistof van daarin aanwezig complement te ontdoen. Maar waar ik te onderzoeken had een antigeen, van wiens wezen totaal niets bekend is, en ik gezien had dat de reactie tusschen het vaccineantigeen en een immuunserum minder duidelijk werd, wanneer dat antigeen eerst door verblijf van een half uur in een waterbad van 56° C. was geïnactiveerd, daar leek het mij het beste eerst na te gaan in hoeverre het te onderzoeken serum in eene in de proef te gebruiken hoeveelheid (0,3 c.M.^{3} van verdunning $^1/_{10}$), eene hoeveelheid complement bevatte die zich bij de reactie kon doen gelden.

Ik verrichtte dit onderzoek volgens het volgende schema:

	0,85 keukenzoutoplossing.	Serum.	Amboceptor.	5% chrom.susp.
1	0	$^1/_{10}$ 1	0,25	0,25
2	0,25	0,75	0,25	0,25
3	0,5	0,5	0,25	0,25
4	0,65	0,35	0,25	0,25
5	0,75	0,25	0,25	0,25

en vond bij het eerste onderzoek dat in geen enkel dezer

buisjes ook maar een spoor haemolyse optrad. Toch bleek mij weldra dat ik dit niet als constant verschijnsel mocht aannemen, toen n.l. een serum ter onderzoek kwam, dat bij bovenstaande proef in hoeveelheid van 0,5 c.M.^{3} nog duidelijke haemolyse deed optreden. Vandaar dat ik voor elk onderzoek eene dergelijke proef met de te onderzoeken sera moest nemen (zie voorproeven). Bij twee sera vond ik eene complementhoeveelheid, die ik niet meende te mogen verwaarloozen en deze sera werden dan ook, veiligheidshalve, niet voor mijne onderzoekingen gebruikt.

Immuunserum. *Ad. 2.* Daar ik kon verwachten dat het antigeen, indien in het serum aanwezig, daarin voor zou komen in zeer sterke verdunning, moest ik de eischen aan het immuunserum hoog stellen.

De konijnen III en XIII (Tabel I) verschaften mij een serum waarvan 0,25 van het serum $^1/_{10}$ nog eene duidelijke complementbindingsreactie gaf met 0,25 vaccine-antigeen $^1/_{100}$ (in herinnering dient gebracht, dat bij de antigeenbereiding de gewasschen koepokstof reeds $^1/_{15}$ verdund wordt).

Het bloed werd steriel uit de Arteria carotis opgevangen en nadat het serum was afgepipeteerd en geinactiveerd, werd per 10 c.M.^{3} serum toegevoegd 0,1 c.M.^{3} van 10% diaphterine-oplossing en de sera in fleschjes in de ijskast bewaard.

Verloop der proeven.

Voorproeven. Ook hier werd begonnen met amboceptortitratie en complementtitratie (zie Hoofdstuk I). Met de hiervoor gevonden verdunningen werd dan ingezet de titratie der antigenen en der sera volgens het volgende schema:

Titratie der sera en der antigenen.

	0,85 % zout-oplossing.	Antigeen of Serum.	Complement.		Ambocoptor.	5 % chrom.-oplossing.
1	0	$^1/_{10}$ 0,5	0,25	Verblijf v. 1 u. bij 37° C.	0,25	0,25
2	0,15	0,35	0,25		0,25	0,25
3	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
4	0,35	0,15	0,25		0,25	0,25
5	0	$^1/_{50}$ 0,5	0,25		0,25	0,25
6	0,25	0,25	0,25		0,25	0,25
7	0,5	0	0,25		0,25	0,25

Deze reactie werd verricht met alle de te gebruiken sera en antigenen en bovendien werd met alle antigenen de volgende reactie ingezet.

	0,85 zoutsolutie.	Antigeen.	Amboceptor.	5 % chrom.opl.
1	0	$^1/_{10}$ 1	0,25	0,25
2	0,25	0,75	0,25	0,25
3	0,35	0,65	0,25	0,25
4	0,5	0,5	0,25	0,25
5	0,75	0,25	0,25	0,25

Uit deze titraties, geregeld als voorproef verricht, kon ik dus aflezen in welke verdunning, eene hoeveelheid van 0,5 c.M^3. der sera en antigenen ieder voor zich, zelve het optreden eener complete haemolyse niet beletten (dit bleek wisselend tusschen $^1/_{10}$ en $^1/_{30}$), en of niet het als antigeen te gebruiken serum zelve eene hoeveelheid complement bevatte, die invloed op de reactie kon uitoefenen.

De twee sera waarin eene dergelijke complementhoeveelheid aanwezig was heb ik, zooals reeds medegedeeld, voor mijne proeven niet gebruikt.

Na deze voorproeven werd dan de eigenlijke proef ingezet volgens het volgende schema:

	0,85% zout-opl.	Antigeen.	Serum.	Complement (in gevonden verd.)		Amboceptor (in gevonden verd.)	5% chrom.-opl.
1	0,2	Serum in de gevonden verdunning 0,3	Immuunserum in de gevonden verdunning 0,25	0,25	Na verblijf van 1 uur bij 37° C.	0,25	0,25
2	0,3	0,2	0,25	0,25		0,25	0,25
3	0,4	0,1	0,25	0,25		0,25	0,25
1	0,2	zelfde serum als boven 0,3	Contrôleserum [1]) in de vonden verdunning. 0,25	0,25		0,25	0,25
2	0,3	0,2	0,25	0,25		0,25	0,25
3	0,4	0,1	0,25	0,25		0,25	0.25
1	0,2	Vacc. ant. 0,3	Immuunserum als boven 0,25	0,25		0,25	0,25
2	0,3	1/10 0,2	0,25	0,25		0,25	0,25
3	0,4	0,1	0,25	0,25		0.25	0,25
4	0,5	0	0,25	0,25		0,25	0,25
1	0,2	vacc. ant. 0,3	Contrôleserum als boven 0,25	0,25		0,25	0,25
2	0,3	1/10 0,2	0,25	0,25		0,25	0,25
3	0,4	0,1	0.25	0,25		0,25	0,25
4	0,5	0	0,25	0,25		0,25	0,25
1	0,25	sera [2]) als boven 0,5	0	0,25		0,25	0,25
2	0,25	vacc. ant. 1/10 0,5	0	0,25		0,25	0,25
3	0,75	0	0	0,25		0,25	0,25

Voor het aflezen der reactie geldt het hierover in Hoofdstuk I gezegde.

Op deze manier werd door mij onderzocht het serum van 25 konijnen. Uitdrukkelijk wil ik nog vermelden dat voor het opvangen van het te onderzoeken bloed uit de

[1]) Serum van een gezond onvoorbehandeld konijn, geïnactiveerd.
[2]) Alle bij de proef, als antigeen en als antiserum gebruikte sera.

oorvene, het oor eerst allerzorgvuldigst gedesinfecteerd werd.

De resultaten van het onderzoek vermeld ik in onderstaande tabel III.

TABEL III.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl.-b.reactie.	Opmerkingen.
XII.	intraperitoneaal 3 c. c. vacc. 1/10.	18 uur na de injectie. 42 1/2 " " " " 114 " " " "	positief. positief. negatief.	
XIII.	rug geschoren, gescarificeerd en m. vacc. behand.	19 1/2 uur na de enting. 43 1/2 " " " " 115 " " " "	zw. pos. zw. pos. negatief.	na 5 dagen matige eruptie.
XV.	intraveneus 5 c.c. vacc. 1/20.	1/2 uur na de injectie. 2 " " " " 18 " " " " 215 " " " "	positief. positief. zw. pos. negatief.	
XVI.	rug geschoren en geënt met vaccine.	1 1/2 uur na de enting. 2 1/2 " " " " 20 1/2 " " " " 72 " " " " 7e dag " " " 12e " " " "	negatief. negatief. positief. *negatief.* *positief.* negatief.	na 6 dagen prachtige eruptie.
XVII.	intraveneus 2 1/2 c.c. vacc. 1/10	3/4 uur na de injectie. 1 1/4 " " " " 18 1/2 " " " " 72 " " " "	positief. positief. zw. pos. negatief.	
XVIII	intraveneus 2 1/2 c.c. vacc. 1/10.	1/2 uur na de injectie. 1 1/4 " " " " 5 " " " " 19 1/2 " " " " 67 " " " " 163 " " " "	positief. positief. positief. zw. pos. negatief. negatief.	

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl.-b.reactie.	Opmerkingen.
XIX.	intravenous 5 c.c. vacc. $^1/_{20}$.	2 uur na de injectie. 5 " " " " 19 " " " " 43 " " " " $91^1/_2$ " " " "	positief. positief. zw. pos. zw. pos. negatief.	
XX.	Rug geschoren en met vaccine geënt.	3 uur na de enting. 15 " " " " 40 " " " " 118 " " " " 7 dg. " " " 12 " " " "	negatief. positief. *zw. pos.* *st. pos.* *zw. pos.* negatief.	5 dagen na de enting eene heele mooie eruptie.
XXI.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	$^3/_4$ uur na de injectie. $1^1/_4$ " " " " 16 " " " " 48 " " " "	positief. positief. zw. pos. negatief.	
XXIII.	rug geschoren en met vacc. geënt.	$2^1/_2$ uur na de enting. 22 " " " " 70 " " " " 5 dg. " " " 8 " " " " 15 " " " "	negatief. positief. positief. *negatief.* *negatief.* *negatief.*	na 5 dagen mooie eruptie.
XXIV.	rug geschoren en met vacc geënt.	$2^1/_2$ uur na de enting. 22 " " " " 70 " " " " 5 dg. " " " 8 " " " "	negatief. positief. positief. *positief.* negatief.	na 5 dagen mooie eruptie.
140.	rug geschoren en met vacc. geënt.	6 dg. na de enting.	*positief.*	na 6 dagen prachtige eruptie.
141.	rug geschoren en met vacc. geënt.	6 dg. na de enting.	*positief.*	na 6 dagen prachtige eruptie.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl.-b.reactio.	Opmerkingen.
122.	rug geschoren en met vacc. geënt. 30 dagen nadien herent.	6 dg. na de herenting.	*negatief.*	5 dagen na de eerste enting mooie eruptie Herenting verloopt als vroegreactie.
123.	rug geschoren en met vacc. geënt. 30 dagen nadien herent.	6 dg. na de herenting.	*negatief.*	als No. 122.
XXVIII.	intraperitoneaal 5 c. c. vacc. $^1/_{10}$ ingespoten.	18 uur na de injectie. 40 " " " " 90 " " " " 6 dg. " " " 35 " " " "	zw. pos. positief. negatief. negatief. negatief.	
XXIX.	intraperitoneaal 5 c. c. vacc $^1/_{10}$ ingespoten.	18 uur na de injectie. 40 " " " " 70 " " " " 7 dg. " " "	positief. positief. negatief. negatief.	
XXVI.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	22 uur na de injectie. 3 dg. " " "	positief. negatief.	
XXVII.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	22 uur na de injectie. 3 dg. " " "	positief. negatief.	
XXX.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	18 uur na de injectie. 4 dg. " " "	positief. uegatief.	

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl.-b.reactie.	Opmerkingen.
XXXI.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	20 uur na de injectie. 5 dg. „ „ „	positief. negatief.	
XXXIII.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	3 dg. na de injectie.	negatief.	
XXXIV.	subkutaan 5 c.c. vacc. $^1/_{10}$.	2 dg. na de injectie.	negatief.	
XXXVI.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	16 uur na de injectie. 30 „ „ „ „ 2 dg. „ „ „ 4 „ „ „ „	positief. positief. negatief. negatief.	
XXXVII.	intraveneus $2^1/_2$ c.c. vacc. $^1/_{10}$.	15 uur na de injectie. 29 „ „ „ „ 3 dg. „ „ „	positief. positief. negatief.	

Conclusie. Zooals uit deze tabel is af te lezen kon ik geregeld gedurende eenigen tijd in het serum van 25 met vaccine voorbehandelde dieren antigeen aantoonen.

Ik wil, de konijnen groepsgewijze beschrijven, volgens de manier van voorbehandeling.

1. *Intraperitoneaal geënt* (n°s XII, XXVIII, XXIX).

Hier kon ik het virus aantoonen van af *18 uur* tot *$42^1/_2$ uur* na de enting. Na dien tijd niet meer.

2. *Intraveneus geënt* (n°s XV, XVII, XVIII, XIX, XXI, XXVI, XXVII, XXX, XXXI, XXXIII, XXXVI en XXXVII).

Bij deze dieren kon ik het antigeen in de circulatie aantoonen $^1/_2$ *uur* tot *44 uur* na de injectie. Na dien tijd bleek het virus verdwenen.

3. *Kutaan geënte konijnen* (n°s XIII, XVI, XX, XXIII, XXIV, 140, 141, 122, 123).

Hierbij deed zich een belangrijk feit voor.

Het antigeen was in de circulatie aan te toonen van af het *15de uur* na de enting. Met uitzondering van konijn XIII (5^e dag negatief) en konijn XXIII (5^e dag negatief) kon ik het antigeen bij de anderen geregeld aantoonen gedurende den tijd der vaccinale eruptie (*5^en*, *6^en en 7^en dag*). Konijn XVI vertoonde dan nog de eigenaardigheid dat het antigeen, dat den 3^en dag niet was aan te toonen, den 7^en dag weer in de circulatie was verschenen.

Ook het serum van konijn XX dat na 40 uur slechts eene zwak positieve reactie vertoonde, gaf na 5 dagen eene sterke complementbindingsreactie. Het ligt voor de hand de oorzaak van het gedurende zoo langen tijd in de circulatie blijven van het antigeen, te zoeken in het feit, dat er zich op den konijnenrug eene vaccine-eruptie ontwikkelt, waarbij zonder twijfel eene virusvermeerdering zal plaats hebben.

Belangrijk schijnt mij ook het verschil dat bestaat tusschen de sera der konijnen 140 en 141 en die der n°s 122 en 123. Waar bij de eerste twee, na 6 dagen het antigeen nog in de circulatie aantoonbaar was, was dit bij de herente konijnen, die daarop met eene vroegreactie gereageerd hadden, verdwenen.

Toch zien we ook bij de kutaan geënte konijnen het antigeen betrekkelijk zeer spoedig (12^e dag) verdwijnen en ook hier rijst dus de vraag: W a a r b l ij f t d a t a n t i g e e n?

De mogelijkheid bestaat dat het in het serum vernietigd wordt en dus nergens elders aan te toonen is; maar toch ook doet zich de mogelijkheid voor, dat het antigeen hetzij b.v. in de inwendige organen of ook mogelijk in de huid gedeponeerd wordt en daar tot antilichaamvorming prikkelt. Behalve bij de kutaan geënte konijnen verloopt er eenigen tijd tusschen het verdwijnen van het antigeen en het optreden der antistoffen in het serum, zoodat een vernietigd worden van het antigeen a priori niet te verwachten was.

Antigeen in organen.

Om deze vraag te beantwoorden moest ik dus het extract van organen, huid en het bloed als zoodanig, samenbrengen met immuunserum en nagaan of daarbij binding van het complement optrad.

Voor de wijze waarop die orgaanextracten bereid werden en voor de titraties hiervan verwijs ik naar Hoofdstuk II. De eigenlijke proef werd verricht volgens het op blz. 74 gegeven schema.

Door deze proeven kreeg ik de volgende resultaten:

TABEL IV.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl.bindingsreactie.	
XV.	intraveneus 5 c.c. vacc. 1/20 in oorvene.	4 maanden na de injectie.	bloed.	negatief.
			leverextr.	negatief.
			nierextr.	negatief.
			beenmergextr.	negatief.
			huidextr.	*positief.* (zeer zw.)
			miltextr.	negatief.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl. bindingsreactie.	
XVII.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{15}$ in oorvene.	$3^1/_2$ maand na de injectie.	*huidextr.*	*positief.*
XIX.	Intraveneus 5 c. c. vaccine $^1/_{20}$ in oorvene.	3 maanden na de injectie.	bloed. leverextr. nierextr. beenmergextr. *huidextr.* miltextr.	negatief negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXII.	Volkomen gezond konijn.		*huidextr.*	*negatief.*
XXVIII.	Intraperitoneaal 5 c.c. vaccine $^1/_{10}$.	6 dg. na de injectie. 35 " " " "	*huidextr.* longextr. miltextr. *huidextr.* trachea- en pharynx-slijmvl.-extract.	*positief.* negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXIX.	Intraperitoneaal 5 c. c. vaccine $^1/_{10}$.	70 u. na de injectie. 7 dg. " " "	*huidextr.* *huidextr.*	*positief.* *positief.*
XXIII.	Rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine behandeld.	15 dg. na de enting.	*huidextr.* hartextr. nierextr longextr. leverextr. miltextr.	*positief.* negatief. negatief. negatief. negatief. negatief.
XXIV.	Rug geschoren, gescarificeerd en met vaccine geënt.	25 dg. na de enting.	hartextr. longextr. leverextr. miltextr. *huidextr.* nierextr	negatief. negatief. negatief. negatief *negatief.* negatief.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Resultaat der compl.bindingsreactie.	
XXVI.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c vaccine $^1/_{10}$.	6 dg na de enting.	*huidextr.*	*positief.*
XXVII.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$.	3 dg. na de injectie.	bloed. hartextr. miltextr. longextr. leverextr. *huidextr.* nierextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXX.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$.	4 dg. na de injectie.	*huidextr.*	*positief.*
XXXI.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$.	5 dg. na de injectie.	*huidextr.*	*positief.*
XXXIII.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$	3 dg. na de injectie.	leverextr. miltextr. nierextr. longextr. tracheaal-slijmvlies-extract. *huidextr.* hartextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.
XXXIV.	Subkutaan 5 c. c. vaccine $^1/_{10}$.	24 dg. na de enting.	bloed. miltextr. longextr. beenmergextr. pharynx- en trach.-slijmvl.-extract. *huidextr.* hartextr.	negatief. negatief. negatief. negatief. negatief. *positief.* negatief.

Nadat ik dus gezien had, dat bij konijnen, waarbij intraveneus en intraperitoneaal vaccine is ingebracht, *het antigeen betrekkelijk zeer snel uit de circulatie verdwijnt*, kon ik door mijne onderzoekingen bewijzen dat *dit antigeen onmiddellijk naar de huid gaat* en daar betrekkelijk nog langen tijd blijft aan te toonen; en kon door dit bewijs dus voor een deel de opvattingen van CALMETTE en GUÉRIN (22) en VON PROWAZEK en YAMAMOTO (24) bevestigen (zie onder). **Conclusie.**

Ik vond bij onderzoek op de aanwezigheid van antigeen:

na 70 uur	:	serum —; huid +.
„ 3 dagen	:	serum —; huid +; organen —.
„ 4 „	:	serum —; huid +.
„ 5 „	:	serum —; huid +.
„ 6 „	:	serum —; huid +.
„ 15 „	:	organen —; huid +.
„ 24 „	:	organen —; huid +.
„ 35 „	:	organen —; huid +.
„ 3 maanden	:	organen —; huid +.
„ $3^1/_2$ maand	:	huid +.
„ 4 maanden	:	huid z. zw. +.

Bij konijn XXIV kon ik na 25 dagen geen antigeen in de huid aantoonen. Ik was helaas niet meer in de gelegenheid de proef met dit extract te herhalen, maar waar alle andere observaties onderling overeenstemmen, meen ik hier aan de een of andere fout bij de proef te moeten denken.

De *vraag* of het aangetoonde antigeen gelijk is te stellen met werkzaam virus, heb ik voorloopig in het midden gelaten. Waarschijnlijk zal de door NOGUCHI (2) aangegeven

methode om levend virus aan te toonen door enting in den konijnentestikel, hetgeen hiervoor eene zeer gevoelige methode schijnt te zijn, nader tot de oplossing van dit vraagstuk kunnen brengen.

Ik wil alleen enkele punten vermelden, die hiermede verband houden.

Ik entte twee konijnen kutaan respectievelijk met serum, waarin antigeen aangetoond was, en met huidextract, waarin antigeen en geen antistoffen.

Bij het konijn, dat met antigeen bevattend serum was geënt, trad totaal geen reactie op.

Het konijn, geënt met huidextract, vertoonde den 5[den] dag na de enting hier en daar enkele schilfers op en langs de scarificatielijnen. Deze schilfers werden met de scherpe lepel verwijderd, fijngewreven met glycerinewater (1 deel op 3 deelen 80 % glyc.water) en hiermede werd wederom een konijn geënt. Deze enting verliep totaal zonder reactie.

Ik wil hier ook nog wijzen op het belangrijke verschil dat er bestaat tusschen mijne resultaten en de door CALMETTE en GUÉRIN (22) en VON PROWAZEK en YAMAMOTO (24) medegedeelde. Immers konden zij tot 2 × 24 uur na de intraveneuze injectie de huid openend, door het optreden eener vaccinale eruptie, daarin virulente vaccine aantoonen. Indien zij na 3 × 24 uur en later deze proef herhaalden trad geen vaccine-eruptie op, m. a. w. was er geen virulente vaccine meer in de huid aanwezig. Waar ik nu ook nà 2 × 24 uur antigeen in de huid kon aantoonen, daar ligt het voor de hand aan te nemen, dat dit antigeen een, niet meer virulent, vaccinederivaat is.

Het feit, dat het antigeen zich via de bloedbaan onmiddelijk uitsluitend naar de huid begeeft, wees, evenals de in Hoofdstuk II beschreven resultaten, wederom in eene speciale richting.

In Hoofdstuk IV zal ik beschrijven, hoe ik de in de Hoofdstukken II en III medegedeelde resultaten met elkaar in verband meende te mogen brengen; en tot welke conclusie dit mij gevoerd heeft.

Proeven genomen bij kippen in verband met de onderzoekingen van Casagrandi. (12).

Mijne resultaten waren dus in tegenspraak met de door CASAGRANDI bij kippen gevonden verschijnselen (zie blz. 64). Het leek mij interessant door enkele proeven met behulp van de complementbindingsmethode na te gaan in hoeverre ik de door CASAGRANDI medegedeelde feiten kon bevestigen. Het lag niet op mijn weg een uitgebreid onderzoek hierover in te stellen. Immers, zooals in Hoofdstuk I medegedeeld, heb ik mij vanaf het begin gehouden aan de vaccine bij het konijn, daar ik dit mede uit onderzoekingen van anderen (34) kende als een voor vaccine gevoelig proefdier, dat voor mijne onderzoekingen geschikt was en hetwelk een belangrijke factor vormt in onze kennis omtrent vaccine-virus en vaccine-immuniteit. Daarom heb ik slechts een klein onderdeel der onderzoekingen van CASAGRANDI in nadere studie genomen, mij stipt houdend aan de door dezen gedane opgaven.

CASAGRANDI (12) beschrijft dat hij met milt, nier, lever, long, hart, beenmerg en hersenen van 14 dagen te voren

onderhuidsch met vaccine ingespoten kippen, vaccinale erupties bij kippen kon opwekken, terwijl dit 38 dagen na de subkutane injectie nog met nier- en hartextract gelukte

Om dit na te gaan werden door mij drie kippen onder de huid aan den thorax ingespoten met 5 cM³. vaccine $^1/_{10}$. (CASAGRANDI doet geen opgave van de door hem ingespoten hoeveelheid).

Kip I wordt 5 *dagen na de injectie* door verbloeding gedood. Er worden geen duidelijke afwijkingen gevonden met name geen croupeus-diphtheritische beslagen op de mond-, pharynx- en oog-slijmvliezen. De plaats der inspuiting vertoont eene lichte vaatinjectie der huid; geen zwelling, geen vocht, geen verdikking van de huid.

Ik nam in onderzoek het serum, de nier, het hart, de long, de lever en de milt, en verrichtte het onderzoek (voorproeven en proef) daarmede volgens de in Hoofdstuk II aangegeven methoden.

Bij de voorproeven bleek het kippenserum eene vrij aanzienlijke hoeveelheid complement te bevatten. Bovendien bleek de eigen remming van het serum groot, zoodat ik, om deze te ontgaan, 0,3 cM.³ van eene verdunning $^1/_{50}$ moest gebruiken. Ook het leverextract bleek sterk te remmen; bij de overige organen viel deze remming weg bij eene hoeveelheid wisselend van 0,3 cM.³ in verdunning $^1/_{10}$ tot $^1/_{20}$. Geen der orgaanextracten bleek zelf haemolytische eigenschappen te bezitten.

Bij mijne p r o e f bleek nu, dat het serum met het immuunserum geen complement bond; *nier-*, *hart-*, *long-* en *lever-*extract gaven eene *zwak positieve complementbindingsreactie*, terwijl deze bij het *milt-*extract *het sterkste* was.

Kip II wordt verbloed *na 14 dagen*. De huid is op de

plaats van injectie sterk geïnjicieerd. Geen vocht is aanwezig, ook geen duidelijke zwelling ter plaatse der inspuiting. Aan den binnenkant der huid zit een dun fibrineus beslag. In de oppervlakkige spierlagen zeer vele petechiën, die in het midden ineengevloeid zijn, samen tot ongeveer rijksdaaldergrootte. Verder geen afwijkingen; met name geen beslagen op mond- en pharynxslijmvlies.

Van nieren, hart, long, milt en lever werden extracten bereid. Al deze extracten bleken bij de voorproeven in hoeveelheid 0,3 cM³. van verdunning $^1/_{15}$ voor de proef bruikbaar te zijn en geen hunner bezat zelf haemolytische eigenschappen.

Bij de eigenlijke proef bleek, dat *long-* en *lever*-extract eene *zwak positieve complementbindingsreactie* met het immuunserum gaven, terwijl de reactie van *nier-*, *hart-* en *milt-extract sterk positief* moest worden genoemd.

Hieruit bleek dus dat 14 dagen na de subkutane injectie in de bovengenoemde organen van de kip nog antigeen aanwezig was.

Kip III wordt *38 dagen na de injectie* door verbloeding gedood. Nergens is eene afwijking te vinden, nòch op de entplaats nòch op de slijmvliezen. In onderzoek komen het hart, de longen, de milt, de lever en de nieren. Behalve het leverextract, dat in verdunning $^1/_{15}$ moest gebruikt worden, bleken de andere orgaanextracten in verdunning $^1/_{10}$ zelf de complete haemolyse niet te belemmeren. Eigen haemolyse vertoonden geen der organen.

Bij de proef blijkt dat de *milt*, de *nieren* en het *hart* met het immuunserum complement binden, terwijl de lever en de longen dit niet blijken te doen.

De extracten uit *dezelfde organen van een* **gezonde kip**

gaven te samen met het immuunserum in alle buisjes complete haemolyse, dus bonden geen complement.

Ik kon dus met de complementbindingsreactie 38 dagen na de subkutane enting het antigeen nog in milt, nier en hart aantoonen, en daardoor de opgaven van Casagrandi bevestigen. Het feit dat Casagrandi alleen door enting met nier en hartextract nog eene vaccinale eruptie kon opwekken, terwijl bij mijne proeven ook de milt antigeen bleek te bevatten, laat, waar ik bij ééne kip de proef instelde, geene conclusies toe.

Maar wel zou ik, in verband met mijne onderzoekingen bij konijnen, er op willen wijzen *dat de vaccine bij het konijn anders verloopt dan bij de kip.* Terwijl bij het konijn het antigeen onmiddellijk naar de huid wordt gevoerd en daar wordt vastgehouden, moet worden aangenomen, dat het subkutaan bij de kip ingebrachte virus door het geheele organisme wordt gevoerd en langen tijd in de verschillende organen aanwezig blijft.

Bovendien wil ik er de aandacht op vestigen dat het in de kippenorganen aangetoonde antigeen, volgens de proeven van Casagrandi, virulente vaccine blijkt te zijn, terwijl dit van het in de konijnenhuid aangetoonde antigeen niet mocht worden aangenomen (zie blz. 84). Dit zou dus wijzen op een *afsterven* van de ingebrachte vaccine in het konijnenorganisme, terwijl de vaccine bij de kip langen tijd *in levenden toestand* in verschillende organen blijft opgehoopt.

LITERATUUR.

1. A l d e r s h o f f. Vaccinelichaampjes. Dissertatie. Utrecht. 1906.

2. N o g u c h i. Pure cultivation in vivo of vaccinevirus free from Bakteria. Journal of experimental Medecine. Vol. 21. n°. 6. 1915.

3. D u v o i r. Etude sur la variolo-vaccine. Thèse de Paris. 1910.

4. R a y n a u d. Etude expérimentale sur le rôle du sang dans la transmission de l'immunité vaccinale. Compt. rend. de l'Acad. des sciences. Tome 84. 1877.

5. —— De l'infection et de l'immunité vaccinales. Bulletin de l'Académie de médecine. 1878.

6. N o b l Beiträge zur Vaccineimmunität. Wiener klin. Woch.schr. 1906.

7. R e i t e r. Studien über Ansteckungsfähigkeit des Kuhpockenstoffes. Arztliches Intelligenzblatt. 1872.

8. L. P f e i f f e r. Die Protozoen als Krankheitserreger. 1895.

9. S i e g e l. Untersuchungen über die Aetiologie der Pocken und der Maul- und Klauenseuche. Anhang zu den Abhandlungen der Königlichen Preuss. Akademie der Wissenschaften. 1905.

10. v. W a s i e l e w s k i. Ueber die Technik des Guarnieri'schen Impfexperimentes und seine Verwendnng zum Nachweis von Vaccineerregern in den inneren Organen von Impftieren. Münch. med. Woch.schr. 1905.

11. P a s c h e n. Handbuch herausgegeben von Kraus und Levaditi, Erster Ergänzungsband. 1911.

12. C a s a g r a n d i. La variole bovine chez les poulets. Revue internationale de la Vaccine. 1910.

13. S i o n et R a d u l e s c o. Généralisation du vaccin. Compte rendu de la Soc. de Biologie de Bucarest. 1913. (Ref. Journ. de Phys. et de Path. gén. 1913.)

14. L. C a m u s. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1913.

15. V a n d e r K a m p. Ueber Filtration des Vakzinevirus und Immunisierung mittels Vakzinefiltrats. Dissertatie. Bern. 1913.

16. V o n P r o w a z e k. Untersuchungen über die Vaccine. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bdd. 22, 1905. 23, 1906 und 26, 1907.

17. H a n s e r. Untersuchungen über den Vaccineerreger. Diss. Freiburg. 1905.

18. J ü r g e n s. Die diagnostische Bedeutung der Variola-Körperchen. Berl. klin. Woch.sch. 1905.

19. O h l y. Ueber die Lebensfähigkeit des Vaccinevirus im Kaninchenkörper. Diss. Marburg. 1906.

20. H a a l a n d. Ueber Lungenveränderungen nach intrapulmonaler Injektion von Vaccinelymphe nebst Bemerkungen über den behaupteten Nachweis des Vaccinevirus in den inneren Organen. Med. Klinik. n⁰. 42. 1905.

21. S ü p f l e. Die Vaccineimmunität. Arch. für Hygiene Bd. 68.

22. C a l m e t t e et G u é r i n. Recherches sur la vaccine expérimentale. Ann. de l'Inst. Past. Tome 15. 1901.

23. C h a u v e a u. Production expérimentale de la vaccine naturelle, improprement appelée vaccine spontanée. Bull. de l'Acad. de Méd. 1865—1866.

24. v P r o w a z e k und Y a m a m o t o. Experimentelle und morphologische Studien über das Vaccinevirus Münchn. mediz. Woch.schr. n⁰. 51. 1909.

25. H a m m e r s c h m i d t. Verwendung von Tierkohle bei Vakzine-Untersuchungen. Wiener klin. Woch.schr. 1915.

26. Z ü l z e r. Variola. Realenzyklopädie. 1890.

27. R o g e r et W e i l Inoculation de la vaccine et de la variole au singe. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1902.

28. v. P r o w a z e k und d e B e a u r e p a i re A r a g ã o. Untersuchungen über die Variola. Münchn. med. Woch.schr. 1908.

29. H i l l and R o s s. Epidemic Generalised Vaccinia. Journal of Hygien. Tom. 10. n⁰. 2. 1910.

30. S ü p f l e. Das Wesen des Impfschutzes im Lichte der neueren Forschungen. Ergebnisse der Immunitätsforschung, etc. Herausgegeben von Weichardt. Bd. I. 1914.

31. M e r e n s. Het bedrijf der koepokinenting. Dissertatie. Amst. 1906.

32. B l o c h m a n n. Ist die Schutzpockenimpfung mit allen notwendigen Kautelen umgeben? 1904.

33. R i t z. Ueber die Inaktivierung des Komplementes durch Schütteln. Zeitschr. f. Immun.forsch. Bd. 15. 1912.

34. P o n d o r f. Die Kaninchenimpfung. Münchn. med. Woch.schr. n⁰. 7. 1912.

HOOFDSTUK IV.

Het moet, dunkt mij, bij het bewerken van een experimenteel onderzoek, wanneer men slechts een vaag vermoeden kan hebben omtrent de antwoorden op de zich gestelde vragen, dikwijls voorkomen, dat men in het begin niet weet welken weg moet worden gevolgd en dat, door een meer of minder toevalligen vondst, eerst duidelijk wordt in welke richting moet worden gezocht.

Zoo is het ten minste mij gegaan bij het bewerken van dit onderzoek.

Uitgegaan van de twee in Hoofdstuk I gestelde vragen, bleken mij de antwoorden op die vragen zoodanig in éene richting te wijzen, dat ik gemeend heb die te moeten inslaan om te trachten datgene, wat ik uit de resultaten mijner onderzoekingen kon „vermoeden", nader tot „zekerheid" te brengen.

Waar ik gezien had, dat het antigeen, korten tijd in de circulatie blijvend, reeds 70 uur na de voorbehandeling in de huid, doch in geen enkele der organen was terug te vinden en de complementbindende antistoffen, die den 6den tot den 7den dag in het serum verschenen, in één geval reeds den 3den dag in de huid werden aangetroffen, daar lag het voor de hand eenig verband tusschen deze verschillende feiten te zoeken en het vermoeden uit te spreken, dat de complementbindende antistoffen bij de vaccine, wat het konijn betreft, in de huid worden geproduceerd.

Men zou in dat geval eene zuiver lokale vorming van antistoffen moeten aannemen en ik wil dus eerst beschrijven wat daarover in de literatuur bekend is.

Over lokale vorming van antistoffen.

Het probleem, wáár in het liehaam antistoffen gevormd worden, heeft men getracht op te lossen volgens de volgende methoden:

In de eerste plaats heeft men gezocht naar de weefsels, waarin het antigeen wordt vastgelegd.

In de tweede plaats heeft men getraeht de aanwezigheid van antiliehamen in de weefsels te bewijzen vóór dat ze in het bloed versehijnen.

Ten derde heeft men studies gemaakt over het effect van orgaanexstirpaties (voornl. van de milt) op den aanmaak van antistoffen.

In de vierde plaats heeft men den invloed van versehillende stoffen en bewerkingen (arseenverbindingen, X-stralen) op de antilichamenproductie nagegaan, en

Ten vijfde bestaan er onderzoekingen over de antiliehaamvorming door weefsels, bij de cultiveering daarvan in vivo en buiten het lichaam.

WASSERMANN en TAKAKI, die reeds op het belangrijke verschijnsel hadden gewezen dat normaal hersen- en ruggemergweefsel steeds antitoxisehe werking tegenover tetanusgift bezit, terwijl geen enkele der andere organen deze eigensehap heeft, meenen in deze eellen ook de plaats van aanmaak der tetanusantitoxinen gevonden te hebben (1) [1].

Dezelfde schrijvers (2) vonden dat, wanneer zij typhus-

---

1) Literatuur aan het einde van het Hoofdstuk.

bacillen intraveneus en subkutaan bij konijnen inspoten, op een gegeven oogenblik beenmerg, milt, en lympheklieren een grooter of evengroot gehalte aan typhusantilichamen bezaten als het bloedserum.

In verband met hunne onderzoekingen, die in overeenstemming te brengen waren met de theorie van EHRLICH, voerden zij het begrip der „*Seitenkettenimmunität*" in, welke zij plaatsten naast de bloed-serumimmuniteit in zooverre, dat bij de „Seitenkettenimmunität" de beschuttingsstoffen nog aan het celcomplex resp. orgaan vastzitten, terwijl zij bij de serumimmuniteit daarvan los zijn.

Specialen nadruk leggen zij, bij het opstellen van dit begrip, op het door hen geleverde bewijs, dat bij het tot stand komen der kunstmatige immuniteit speciale organen resp. celgroepen eene belangrijke rol spelen bij de vorming der antilichamen.

Ongeveer tezelfder tijd ontdekten PFEIFFER en MARX (3) de vormingsplaatsen der baktericide antilichamen bij het konijn, dat met choleravibrionen was ingespoten.

Zij zagen dat bij deze dieren een zeer snelle vorming van antilichamen plaats had en hoopten nu, door het quantitief onderzoek van verschillende orgaanextracten op hun beschuttingsvermogen (volgens de methode van PFEIFFER in de peritoneaalholte van de cavia) het moment te vinden, waarop dit vermogen van een der orgaanextracten grooter was dan dat van het serum.

Inderdaad zagen zij dat zelfs reeds 24 uur na de intraveneuze injectie de milt eene belangrijke hoeveelheid bakteriolytische stoffen bevatte, terwijl deze op dat tijdstip nog totaal niet aanwezig waren in het bloedserum. Na vijfmaal 24 uur vonden zij behalve in de milt ook een

relatief hoogen titer voor beenmerg en lymphoklieren. Bij het verder gaan van het immuniseeringsproces nam het antilichamengehalte van het bloedserum toe, dat van bovengenoemde organen af, tot er evenwicht was.

Om de vraag te beantwoorden of die antilichamen in de milt ontstaan dan wel of deze slechts het depot daarvoor is, spoten zij cholera-immuunserum in en vonden dan geen verhoogd gehalte van het miltextract.

Bij dieren waarbij de milt was geëxstirpeerd, en waar zij toch eenen hoogen titer van het serum zagen optreden, zouden dan andere organen (beenmerg, lympheklieren) vicarieerend gaan optreden.

DEUTSCH (4), die deze proeven met typhusbacillen herhaalde en kon bevestigen, zag dat die vicarieerende werking in belangrijke mate achterwege blijft, indien de miltexstirpatie geschiedt wanneer de immuunlichamenproductie al begonnen is (3—5 dagen na de injectie); hetgeen zou bewijzen dat de antigenen op dien tijd al grootendeels in de milt gefixeerd zijn. DEUTSCH meent dat, gezien het lymphatische karakter der genoemde organen, het de leucocyten zijn die de antilichamen vormen.

VAN EMDEN (5) vond, dat de specifiek agglutineerende stoffen zich bij konijnen, die ingespoten waren met bac. aerogenes, aanvankelijk speciaal in de milt vormden, daarnaast echter ook in de lympheklieren en het beenmerg. Toch zag hij dat ook andere organen (lever, nieren, longen), zij het dan ook in mindere mate, aan de productie der agglutininen deelnemen.

Ook JATTA (6) vond het agglutineerend vermogen van de milt 2—4 dagen na de voorbehandeling met typhusbacillen belangrijk hooger dan dat van het serum. Na

4 dagen trad er evenwicht op en na 8 dagen was het gehalte van het serum veel grooter.

CASTELLANI (7) vond bij dieren die met dysenteriebacillen waren ingespoten steeds in de eerste dagen het serum rijker aan agglutinen dan de milt, terwijl daarentegen de milt meer bactericide stoffen (bepaald volgens 't phenomeen van PFEIFFER) dan het serum bevatte.

Wanneer uit bovengenoemde proeven blijkt dat speciaal de milt, de lympheklieren en het beenmerg als plaatsen van antilichamenproductie mogen worden beschouwd, dan mag daaruit niet worden afgeleid, dat deze organen het alleen zijn die immuunstoffen kunnen produceeren.

RÖMER (8) immuniseerde konijnenconjunctivae tegen abrine door dit gift in stijgende doses in den conjunctivaalzak te brengen. Hij zag dat de fijngewreven conjunctiva van het behandelde oog in staat was eene voor de muis doodelijke hoeveelheid gift te neutraliseeren, terwijl de conjunctiva van het andere oog geen invloed op het gift uitoefende. RÖMER zag verder dat op een bepaald tijdstip de milt en het beenmerg een hoogeren giftneutraliseeringstiter vertoonden dan het serum en besluit uit deze onderzoekingen, dat bij de conjunctivale immuniseering de reageerende conjunctiva een deel van de antitoxine levert; de overige hoeveelheid gift, die tot resorptie komt, prikkelt verder de bloedvormende organen tot antitoxinevorming.

Ook VON DUNGERN deed proeven die hierbij aansluiten (9, 10). Het gelukte hem nl. eene lokale vorming van praecipitinen aan te toonen doordat hij bij een konijn majaserum in de voorste oogkamer inspoot en dan tusschen

het 8 dagen hierna afgelaten kamervocht en het majaserum eene duidelijke praecipitatiereactie zag optreden, terwijl deze reactie niet optrad tusschen majaserum en het kamervocht van het andere oog.

In 1905 kwam WASSERMANN onder medewerking van CITRON op zijn bovengenoemde onderzoekingen terug (11). In verband met het feit dat zoowel bij zijne eigene als bij de onderzoekingen van anderen de als antigeen werkzame micro-organismen subkutaan of intraveneus waren ingebracht, stelden zij zich de vraag of niet juist daarom speciaal in de bloedvormende organen (waarmede de antigenen toch het eerste in aanraking kwamen) dat antigeen gebonden werd.

Om antwoord op deze vraag te verkrijgen gingen zij als volgt te werk.

Naast intraveneuze injecties spoten zij konijnen intraperitoneaal en intrapleuraal met typhusbacillen in en wekten tevens peritoneaal- resp pleuraalexsudaat op door daar ter plaatse aleuronaatpap in te spuiten.

Het resultaat was, dat zij zóó vaak den hoogsten titer in het pleuraalvocht bij intrapleuraal ingespotenen, in het peritoneaalvocht bij intraperitoneaal ingespotenen en in het serum bij intraveneus voorbehandelden zagen, dat zij, zonder dit met mathematische zekerheid te kunnen bewijzen, hieruit meenen te mogen besluiten, dat de mogelijkheid van antiliehaamvorming door peritoneaal- en pleuraal-cellen, naast die in de bloedvormende organen, door hunne proeven bewezen is.

Zij bepaalden het bactericide vermogen van de te onderzoeken vloeistoffen, hetzij door volgens de methode van STERN en KORTE (12) de vloeistof in te laten werken op

eene typhuscultuur in bouillon en dan platen te gieten, hetzij door de proef van PFEIFFER.

Op grond van hunne onderzoekingen meenen WASSERMANN en CITRON dat het feit bestaat, dat niet een bepaald orgaanweefsel, maar de meest verschillende cellen, naar gelang van de gelegenheid die zij hebben om specifieke stoffen te binden, antilichamen kunnen produceeren; en in verband hiermede wijzen zij op de belangrijkheid van het vraagstuk der *lokale weefselimmuniteit* (Zie Hoofdstuk V).

HECK (13) vond, dat bij actief tegen typhus geïmmuniseerde caviae, die hij intraperitoneaal met typhusbacillen behandelde, deze het eerst uit het beenmerg en de milt verdwenen waren, terwijl ze na 70 uur nog in de lever en de nieren konden worden aangetoond. Hij zoekt deze waarneming te verklaren door aan te nemen, dat beenmerg en milt ook de plaatsen zijn waar de bactericide antilichamen worden gevormd en opgehoopt.

HEIM (14) vond dat, naast andere organen, speciaal de spieren van tegen pneumococcen geïmmuniseerde konijnen rijk zijn aan bactericide antistoffen; hij meende op grond hiervan dat deze waarschijnlijk de antistoffen vormen.

BEZZOLA (15) herhaalde deze experimenten met choleravibrionen en kon de door HEIM verkregen resultaten niet bevestigen.

HEKTOEN en CARLSON (16) vonden bij honden na éénmalige intraveneuze injectie met ratten- of schapenbloed steeds het hoogste gehalte aan antilichamen (lysinen, agglutininen en opsoninen) in het bloed; in de lymphe was het gehalte veel kleiner, terwijl cerebrospinaalvloeistof en kamervocht slechts sporen bevatten. Zij immuniseerden ook

passief door bij een hond bloed af te tappen en dit te vervangen door bloed van voorbehandelde dieren. Zij zagen dan na 30 minuten reeds antilichamen in de lymphe verschijnen en vonden na korten tijd hetzelfde beeld als bij actieve immunisatie; daaruit trokken zij de conclusie dat het verschillende gehalte aan antilichamen van serum en lymphe alleen een gevolg is van de antilichamenconcentratie in het bloed en van de uitwisseling tusschen bloed en lymphe, zonder dat het eene conclusie toelaat omtrent de vormingsplaats der antilichamen.

Zij konden nl. aantoonen dat de vorming der antilichamen buiten het bloed moest plaats hebben, doordat honden, die in den tijd, welke tusschen injectie en verschijnen van de antilichamen verliep, werden verbloed en normaal bloed daarvoor in de plaats kregen, eene levendige antilichamenvorming vertoonden, terwijl bij normale honden, waarbij het bloed van de voorbehandelde ingespoten werd, geen antilichamen optraden.

In het volgende jaar publiceerde Hektoen (17) eene serie experimenten waaruit blijkt, dat het hem niet gelukt was, in de voorste oogkamer, in de pleura, in het peritoneum en in de subkutis lokale antilichaamvorming aan te toonen.

Voor enkele maanden verscheen eene publicatie van Hektoen en Curtis (18). Zij zagen dat totaalexstirpatie van maag, dunne darm en glandula thyreoidea geen invloed had op het opsonine- en agglutinine-gehalte van het serum van met rattenbloed intraveneus geïnjicieerde honden. Pankreatectomie (bij honden, waar weliswaar eene invaginatie en rabies als complicaties optraden) gaf wel vermindering van het antilichaamgehalte.

Gelijktijdige verwijdering van pankreas en milt geeft

dezelfde vermindering in antilichaamproductie als verwijdering van de milt alleen.

Verwijdering van de bijnier op het hoogtepunt van de hoeveelheid antilichamen verandert het gehalte aan antistoffen niet.

Zij vonden dat bij ratten de verwijdering van eene leverhelft geene verandering geeft in het gehalte aan lysinen tegenover schapenbloedlichaampjes.

Mc. Gowan (19) ziet in de lever een belangrijk orgaan voor de antilichamenproductie. Verwijdering van milt, schildklier en nier verhindert niet bij konijnen de kritische verschijning van haemolytische antistoffen, op den 3^{den} dag na de intraveneuze injectie met runderbloedlichaampjes. Hij vond na intraveneuze, intraperitoneale of subkutane injectie van runderbloed bij konijnen nooit leucocytose en wil op dien grond een aandeel der leucocytaire organen bij den aanmaak van de immuunlichamen buitensluiten.

Wel zag hij na enterale toediening van runderbloed haemolysinen, agglutininen en praecipitinen in het bloed optreden.

Paetsch (20) kon de vroeger genoemde resultaten van Wassermann en Citron niet bevestigen. Integendeel, hij vond nooit bij dieren, waarbij het antigeen (El-Tor-vibrionen) intrapleuraal of intraperitoneaal was ingebracht, een verhoogd gehalte aan immuunstoffen in de, ter plaatse van de injectie, verwekte exsudaten.

Ook de weefsels zelve (pleura en peritoneum), die het eerst met het antigeen waren in aanraking gekomen, vertoonden geen verhoogde hoeveelheid antilichamen.

Het lijkt mij jammer dat Paetsch met El-Tor-vibrionen heeft gewerkt en niet evenals Wassermann en Citron typhusbacillen als antigeen heeft genomen. Immers, alleen

dàn zouden zij door hunne onderzoekingen die van WASSERMANN en CITRON in waarde kunnen doen verliezen.

GIRGOLAFF deed, eerst in samenwerking met FRIEDBERGER (21), onderzoekingen over het anaphylaxievraagstuk. Zij vonden, dat wanneer bij caviae bloedledige organen van voorbehandelde dieren intraperitoneaal geïnplanteerd werden, die dieren anaphylactisch werden tegenover het eiwit waarmede de voorbehandelde dieren waren ingespoten.

Later vond GIRGOLAFF (22), dat wanneer hij bloedledige organen van geïmmuniseerde dieren in de buikholte van normale dieren inplanteerde, er bij die dieren eene duidelijk aantoonbare antilichamensecretie optrad.

Voornamelijk vond hij dit bij inplantatie van nier en milt en van deze beiden gaf de milt de sterkste reactie. Dat deze antilichaamvorming niet, zooals voor de hand lag te denken, was toe te schrijven aan geïnplanteerd antigeen, werd door contrôleproeven uitgesloten; zoodat moet worden aangenomen, dat de geïnplanteerde orgaanstukken, welke door de immuniseering het vermogen om antistoffen te produceeren verkregen hebben, dit vermogen behouden ook na de overbrenging in een ander dier.

Ook de proeven van CARREL en INGEBRIGSTEN (23) spreken voor eene lokale productie van antilichamen. Deze onderzoekers voegden bij culturen van overlevende stukjes beenmerg en lympheklieren van caviae eene minimale hoeveelheid schapenbloedlichaampjes. Na 4—5 dagen konden zij dan uit deze weefsels eene vloeistof extraheeren die haemolytische eigenschappen tegenover schapenbloedlichaampjes had. Deze eigenschappen ontbraken aan eene vloeistof uit contrôleculturen bereid.

Ook LÜDKE (24) verrichtte proeven in deze richting. Hij

verkreeg de beste resultaten (onderzoek op de aanwezigheid van bakteriolysinen, agglutininen, haemolysinen) wanneer milt en beenmerg 24—60 uur na de voorbehandeling met gedoode bacteriën werden gecultiveerd. Veel minder succes had hij, bij het samenbrengen van het antigeen met de reeds uit het lichaam gescheiden cellen.

Reiter (25) kon door transplantatie- en cultuur-proeven in vitro de beteekenis van milt, beenmerg, lympheklieren en bovendien ook van de nier voor den aanmaak van antilichamen aantoonen.

Przygode (26) toonde eveneens door weefselcultuurproeven aan, dat de milt in staat was, tegenover typhusbacillen als antigeen, agglutininen te vormen.

Violle (27) aspireerde de gal uit de galblaas, spoot verschillende mikro-organismen (choleravibrionen, typhus-, coli- en tuberkelbacillen) er in en sloot de injectieplaats door eene ligatuur. Volgens hem berust de antilichaamvorming op eene leucocytaire werking, want hij vond de galblaas nog na meerdere weken met leucocyten opgevuld. Reseceert men na 14 dagen de galblaas, zoo verdwijnen de antilichamen snel uit het bloedserum.

Van Calcar (28) hecht, op grond zijner onderzoekingen, aan het vaatendotheel eene groote beteekenis voor de productie van lytische antilichamen.

Het moet ons betrekkelijk verwonderen dat, bij het onderzoek naar lokalen aanmaak van antistoffen, de *vaccine* nog zoo goed als niet in een dergelijk onderzoek betrokken is. Immers juist bij de vaccine is eene algemeene immuniteit naar achteren gedrongen en heeft men gesproken van eene van de huid uitgaande immuniteit en algemeen wordt de

specifieke affiniteit tusschen het vaccinevirus en de huid aangenomen, mede op grond waarvan LIPSCHÜTZ (29) van „dermotropismus" heeft gesproken. Temeer kan het ons verwonderen, waar juist het wezen eener zuiver lokale immuniteit, voor een groot deel aan de hand der vaccine bestudeerd is, nl. aan de verhoudingen der cornea-immuniteit na eene enting met vaccine.

Van de enkele onderzoekingen, die ik in de literatuur besproken vond, wil ik eene proef vermelden door ARNDT (30) naast andere experimenten beschreven. Nadat ARNDT gevonden had, dat epitheel, afgeschrapt tusschen 8 en 18 dagen na eene kutane enting op den konijnenrug, in staat was om vaccinelymphe onwerkzaam te maken, wilde hij onderzoeken of hij door subkutane inbrenging van zulk afschrapsel, (waarin dus antilichamen) passief kon immuniseeren.

Hiertoe spoot hij bij een konijn afgeschrapt epitheel van een 10 dagen te voren kutaan geënt konijn in en zag, dat dat konijn op eene 10 dagen daarna verrichte enting niet reageerde. Mijns inziens mag men hier echter geenszins van eene zekere passieve immuniseering spreken, daar toch 10 dagen na eene huidenting in de huid naast mogelijke antilichamen ook de aanwezigheid van antigeen moest worden verondersteld, zoodat het uitblijven van eene reactie 10 dagen na de inspuiting wel zou kunnen berusten op eene aktieve immuniseering.

VON PROWAZEK (31) vond, dat enting met materiaal eener cornea die 2—10 weken te voren met vaccine geënt was, op eene andere cornea nog lichaampjes van Guarnieri in het epitheel gaf. Eene dergelijke activiteit van eene geïnfecteerde cornea, wordt door toevoeging van eene ongeveer gelijke hoeveelheid celmateriaal eener genezen, immune

cornea verminderd of vernietigd, wanneer men de cellen waarin de immuunlichamen zouden zitten, mechanisch of door trypsinevertering uiteenhaalt en de beide celderivaten, na ze goed te hebben gemengd, eenigen tijd op elkaar laat inwerken.

Paschen (32) kon geen viruliciide werking constateeren bij samenbrenging van vaccinelymphe en afgeschrapt epitheel.

Lokale aanmaak in de huid der complementbindende antistoffen bij vaccine.

Wanneer ik mij de vraag ga stellen in hoeverre ik, in verband met de in Hoofdstuk II en III beschreven onderzoekingen, *argumenten* kan aanvoeren, die wijzen op eenen lokalen aanmaak der complementbindende antistoffen in de huid, dan zou ik de volgende willen noemen:

In de eerste plaats is het antigeen, na korten tijd te hebben geeirculeerd in den bloedsomloop, onmiddellijk nadat het daaruit verdwenen is, in de huid aan te toonen.

In de tweede plaats is nooit het antigeen, nadat het uit het serum is verdwenen, in het bloed of eenig inwendig orgaan of in slijmvlies gevonden.

In de derde plaats blijft het antigeen, naast antistoffen, langen tijd in de huid aantoonbaar.

In de vierde plaats zijn antistoffen, na uit het serum te zijn verdwenen, nooit in het bloed of eenig inwendig orgaan of in slijmvlies aangetoond kunnen worden.

Om nu zekerheid te verkrijgen, moest worden gezocht naar het moment waarop de complementbindende stoffen wèl in de huid maar nog niet in het serum aanwezig waren.

De resultatən van dit onderzoek vermeld ik in de volgende Tabel. Om den gang van zaken overzichtelijk te maken, heb ik hierin tevens het onderzoek van serum en huid op antigeen ingevoegd.

TABEL V.

Konijn	Wijze van voorbehandeling.	Tijd van de proef.	Onderzoek van het *serum* op		Onderzoek van de *huid* op	
			Antigeen.	Antilichaam.	Antigeen.	Antilichaam.
XXVI.	Intraveneus	22 u. na de inj.	+	—		
	$2^{1}/_{2}$ c.c.	3 dg. „ „ „	—	—		
	vaccine $^{1}/_{10}$.	6 „ „ „ „	—	zw. + [1]	+	+ [1]
XXX.	Intraveneus	18 u. na de inj.	+	—		
	$2^{1}/_{2}$ c.c.	4 dg. „ „ „	—	—	+	+
	vaccine $^{1}/_{10}$.	6 „ „ „ „		—	+	+
		8 „ „ „ „		+		+
XXXI.	Intraveneus	20 u. na de inj.	+	—	—	—
	$2^{1}/_{2}$ c.c.	5 dg. „ „ „	—	—	+	+
	vaccine $^{1}/_{10}$.	7 „ „ „ „		+		
XXXVI.	Intraveneus	16 u. na de inj.	+	—		
	$2^{1}/_{2}$ c.c.	30 „ „ „ „	+			
	vaccine $^{1}/_{10}$.	2 dg. „ „ „	—	—	+	—
		4 „ „ „ „	—	—	+	+
		6 „ „ „ „		—		
		8 „ „ „ „		+		
XXXVII.	Intraveneus	15 u. na de inj.	+	—		
	$2^{1}/_{2}$ c.c.	29 „ „ „ „	+			
	vaccine $^{1}/_{10}$.	3 dg. „ „ „	—	—	+	z. zw. +
		5 „ „ „ „		—	+	+
		6 „ „ „ „		z. zw. +		
		7 „ „ „ „		+		

Uit deze tabel is zeer duidelijk den loop van het proces af te lezen. Het intraveneus ingebrachte antigeen circuleert eenigen tijd en begeeft zich naar de huid. Aldaar begint

---

[1]) Bij *quantitatief onderzoek* van serum en huid bleek 0,25 c.M³. serum $^{1}/_{30}$ met 0,2 vacc. antigeen geen complement meer te binden, terwijl die hoeveelheid antigeen met 0,25 c.M³. huidextr. $^{1}/_{30}$ nog eene duidelijk positieve reactie gaf.

de aanmaak der complementbindende antistoffen die den 3en—4en dag in de huid zijn aan te toonen. Van af de huid worden zij aan het serum afgegeven, waarin zij den 6en—7en dag verschijnen.

Ik meen dus bewezen te hebben dat als reactie op het ingebrachte antigeen het konijnenorganisme antistoffen maakt, die door middel van de complementbindingsmethode zijn aan te toonen; welke antistoffen hun ontstaan vinden in de huid. **Conclusie.**

Verband tusschen immuniteit en complementbindende antistoffen?

Geeft nu dit bewijs het recht om bij de vaccine te spreken van eene histogene immuniteit? Alleen dàn zou men mijns inziens deze vraag bevestigend mogen beantwoorden, indien bewezen was, dat de complementbindende stoffen, zooals die als vitale reactieproducten in het konijnenorganisme na eene infectie met vaccine optreden, direct als verweermiddelen van het organisme dienst deden, m. a. w. er toe bijdroegen het organisme onontvankelijk s. immuun te maken.

Immers juist bij de vaccinatie heeft VON PIRQUET (33) er op gewezen dat naast zuivere immuunlichamen (die dus beschutten) er antilichamen optreden die integendeel overgevoelig maken, en die op gegeven oogenblikken hunne werking kunnen doen overheerschen. Op grond hiervan wilde VON PIRQUET den toestand waarin het organisme geraakt door de vaccinatie geen *immuniteit* (immunis = vrij van belasting en dergelijke lasten) noemen maar sprak van *allergie* (ἄλλος = ander; en ἔργον = werk, werking).

Door de latere onderzoekingen voornamelijk van RICHET (34) is het zeker geworden dat als reactie op eene infectie of intoxicatie het organisme in twee tegenover elkaar staande richtingen kan reageeren nl. in de richting der *immuniteit* (*phylaxie* van RICHET) en in die der *anaphylaxie* (van

RICHET). De *allergie* (VON PIRQUET) omvat beide toestanden van het organisme, in welke der twee richtingen het dan ook moge gereageerd hebben.

Dat men dus het optreden der complementbindende stoffen bij het, met vaccine voorbehandelde konijn, mag beschouwen als eene uiting van het proces dat het konijn allergisch maakt, ligt voor de hand. Maar, waar over het directe verband tusschen werkelijke immuniteit (s. onontvankelijkheid) en complementbindende antistoffen niets vaststaat, mag ik dus, zonder meer, niet uit het feit dat die antistoffen in de huid ontstaan concludeeren dat ook de immuniteit bij de vaccine eene histogene is.

Wel wordt deze opvatting, door het feit dat, wat betreft de complementbindende antistoffen, de reactie op ingebracht antigeen in de huid verloopt, *uiterst aannemelijk*. Te meer, waar het vaststaat dat de huidimmuniteit reeds tot uiting kan komen, door eene verandering der eruptie bij herenting, op een moment dat in het serum nog geene antistoffen zijn aan te toonen. Zoo vonden HENSEVAL en CONVENT (35), regelmatig den 4^{en} dag bij herenting eene veranderde reactie van de huid, terwijl eerst vanaf den 7^{en} tot 10^{en} dag het viruliciде vermogen van het serum duidelijk werd.

Waar nu dit feit, met de door mij voor de complementbindende antistoffen gevondene in volkomen overeenstemming is, en waar een als antigeen werkend deel van de, ter verkrijging van de immuniteit, ingebrachte vaccine na korten tijd uitsluitend in de huid is terug te vinden, daar ligt het toch voor de hand om aan te nemen dat de vorming der immuniseerende antilichamen ook in de huid geschiedt; daarbij in het midden latende of de complementbindende antistoffen daartoe al dan niet gerekend moeten

worden. Ik zou, in dit verband, nog willen herinneren aan de op blz. 84 uitgesproken veronderstelling. Ik sprak daar n.l. op grond van het verschil tusschen mijne resultaten en die van CALMETTE en GUÉRIN (l. c.) en VON PROWAZEK en YAMAMOTO (l. c.), de waarschijnlijkheid uit, dat het door mij aangetoonde antigeen een niet meer virulent vaccine-derivaat zijn zou. Deze uitspraak vereischt nù, in het licht der in dit Hoofdstuk beschreven onderzoekingen, nadere toelichting. Waar toch reeds den 3den—4den dag de complementbindende antistoffen in de huid zijn aan te toonen en op dien tijd zich ook de immuniteit der huid begint te openbaren, daar is het zeer wel aan te nemen dat de bovengenoemde onderzoekers na 3 × 24 uur geen vaccinale eruptie verkregen, omdat op dat moment reeds antistoffen in de huid aanwezig zijn, die eene manifestatie van het virus onmogelijk maken. Hierbij kan dan òf het virus door de antistoffen worden beschadigd en afgebroken, maar ook kan de virulentie blijven bestaan en toch iedere ontwikkeling dadelijk door aanwezige antilichamen worden onmogelijk gemaakt.

Op grond mijner onderzoekingen en de boven uitgesproken overwegingen zou ik willen komen tot de volgende conclusie:

Het, door mij aangetoonde feit, dat de, als reactieproduct op het inbrengen van vaccine, in het konijnenorganisme optredende complementbindende antistoffen ontstaan in de huid en in geen enkel der andere onderzochte organen, maakt de opvatting zeer aannemelijk dat de vaccine-immuniteit eene **histogene** *is.*

LITERATUUR.

1. Wassermann und Takaki. Ueber tetanusantitoxische Eigenschaften des normalen Centralnervensystems. Berl. klin. Woch.schr. n⁰. 1. 1898.

2. —— Weitere Mittheilung über Seitenketten-Immunität. Berl. klin. Woch.schr. n⁰. 10. 1898.

3. Pfeiffer und Marx. Die Bildungstätte der Choleraschutzstoffe. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankh. Bd. 27. 1898.

4. Deutsch. Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. Ann. de l'Inst. Pasteur. Tome 13. 1899.

5. Van Emden. Ueber die Bildungsstätte der agglutinierenden Substanzen bei der Infektion mit Bacillus aerogenes. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 30. 1899.

6. Jatta. Experimentelle Untersuchungen über die Agglutination des Typhusbacillus und der Mikro-organismen der Coligruppe. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 33. 1900.

7. Castellani. Ueber das Verhältniss der Agglutinine zu den Schutzkörpern. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 37. 1901.

8. Römer. Experimentelle Untersuchungen über Abrin-(Jequiritol-) Immunität als Grundlagen einer rationellen Jequrity-Therapie. von Graefe's Archiv für Opthalmologie. Bd. 52: 1901.

9. von Dungern. Die Antikörper. 1903.

10. — Spezificität der Antikörperbildung. Festschrift zum sechzigsten Geburtstage von Robert Koch. 1903.

11. Wassermann und Citron. Ueber die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 50. 1905.

12. Stern und Korte. Ueber den Nachweis der bakteriziden Reaktion. Berl. klin. Woch.schr. n⁰. 9. 1904.

13. Heck. Untersuchungen über das Vorkommen und die Lebensdauer von Typhusbakterien in den Organen gegen Typhus aktiv im-

munisierter und nicht immunisierter Tiere. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 56. 1907.

14. Heim. Erschliessung ergiebiger Quellen von Schutzstoffen. Münchn. med. Woch.schr. n⁰. 1. 1909.

15. Bezzola. Können die Muskeln als Bildungsstätte der Antikörper betrachtet werden? Centr.bl. f. Bakt. Bd 50. 1909.

16. Hektoen and Carlson. On the distribution of antibodies and their formation by the blood. Journ. of infekt. diseases. Vol. 7. n⁰. 2. 1910.

17. Hektoen. On the local production of antibodies. Journal of inf. diseases. Vol. 9. n⁰. 2. 1911.

18. Hektoen and Curtis. The effect on antibody production of the removal of various organs. Journ. of inf. diseases. Vol. 17. n⁰. 2. 1915.

19. Mc. Gowan. Some investigations into the problem of the origin of immune body. Journ. of Path. and Bact. Vol. 15. 1911. (Ref. Zeitschr. f. Imm.forsch. Ref. 1911).

20. Paetsch. Ueber lokale Immunkörperbildung. Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. 60. 1911.

21. Friedberger und Girgolaff. Die Bedeutung sessiler Rezeptoren für die Anaphylaxie. Zeitschr. f. Imm.forsch. Bd. 9. 1911.

22. Girgolaff Ueber die Antikörpersekretion durch implantierte Organstücke vorbehandelter Tiere in normale. Zeitschr. f. Imm.forschung. Bd. 12. 1912.

23. Carrel et Ingebrigsten. Production d'anticorps par des tissus vivant en dehors de l'organisme. Compt. rend. de la Soc. de Biol. n⁰. 6. 1912.

24. Lüdke. Ueber Antikörperbildung in Kulturen lebender Körperzellen. Berl. klin. Woch.schr. n⁰. 22. 1912.

25. Reiter. Studien über Antikörper: Bildung in vivo und in Gewebskulturen. I. Mitteilung. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 18. 1913.

26. Przygode. Ueber die Bildung spezifischer Agglutinine in künstlichen Gewebskulturen. Wien. klin. Woch.schr. n⁰. 21. 1913.

27. Violle. De la vésicule biliaire envisagée comme lieu d'inoculation. Contribution à l'étude de l'immunité et à la physiologie générale. Ann. de l'Inst. Past. n⁰. 26. 1912.

28. van Calcar. Voordrachten over algemeene biologie. 1915.

29. Lipschütz. Filtrierbare Infektionserreger. Handb. der pathogenen Mikro-organismen. v. Kolle und v. Wassermann. Bd. 8. 1913.

30. Arndt. Studien zur Immunität und Morphologie bei Vaccine. Centr. Blatt f. Bakt. etc. Bd. 47. 1908.

31. Von Prowazek. Untersuchungen über den Erreger der Vaccine II. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd 23. 1906.

32. Paschen. Ueber den Erreger der Varolavaccine. Immunitätsverhältnisse u. s. w. Handb. v. Kraus und Levaditi. Erster Ergänzungsband. 1911.

33. Von Pirquet. Klinische Studien über Vakzination und vakzinale Allergie. 1907.

34. Courmont. De l'anaphylaxie. Nouveau traité de Pathologie générale publié par Bouchard et Roger. 1912.

35. Henseval et Convent. Recherches sur l'immunité vaccinale. Revue Int. de la Vaccine. 1912—1913. Tome 3.

HOOFDSTUK V.

Nadat ik dus, zooals ik in Hoofdstuk IV heb uiteengezet, door mijne onderzoekingen de opvatting waarschijnlijk gemaakt heb, dat de vaccine-immuniteit eene histogene immuniteit is, blijft de vraag open of deze histogene immuniteit eene *algemeene* of eene *lokale* is; m. a. w. of nieuw binnendringend virus in het organisme wordt bestreden door van uit de huid uitgezonden antistoffen of wel dat het virus direct of indirect in de huid gekomen, daar ter plaatse wordt onschadelijk gemaakt.

Lokale immuniteit der cornea bij vaccine-enting.

Nu is, zooals in het vorige hoofdstuk medegedeeld, juist deze *lokale immuniteit* aan de hand der vaccine bestudeerd.

In 1903 is het aan Paschen (1) [1] opgevallen dat de corneae van kutaan geïmmuniseerde konijnen ontvankelijk blijven voor eene nieuwe enting, terwijl omgekeerd corneale enting de dieren niet onontvankelijk maakt voor eene huidenting, maar wel immuniteit der geënte cornea geeft Ook von Prowazek (2) en Jürgens (3) konden dit feit constateeren, en von Prowazek wijst er op dat het kamervocht van het geïmmuniseerde konijn nooit virulicide eigenschappen bezit.

Kraus en Volk (4) bebben bewezen dat bij konijnen

---

1) Literatuur: aan het einde van dit hoofdstuk.

noch door subkutane, noch door intraperitoneale, noch door intraveneuze enting met geconcentreerde of verdunde vaccinelymphe eene immuniteit der cornea is op te wekken. Bij apen zagen zij in zeldzame gevallen, na subkutane injectie van vaccine, eene gedeeltelijke of zelfs totale immuniteit der cornea optreden. Wanneer zij de conjunctiva van het onderste ooglid infecteerden, zagen zij eene immuniteit van de cornea van dat oog en van de algemeene huid intreden; de cornea van het andere oog echter bleef ontvankelijk.

Ook Süpfle (5) plaatst zich op het standpunt dat cornea-immuniteit en immuniteit van het overige organisme twee gescheiden, parallel verloopende processen zijn.

Hiertegenover staan de meeningen van Bélin (6) en Grüter (7).

Bélin beweert dat door eene kutane enting met zeer veel vaccinelymphe eene immuniseering der cornea kan bereikt worden.

Grüter komt op grond van uitgebreide onderzoekingen tot de conclusie, dat zoowel door kutane als door subkutane, maar speciaal door intraveneuze enting, een zekere graad van immuniteit der cornea ontstaat. Hij kon in de corneae en in de voorkamer van geïmmuniseerde dieren viruliciede antistoffen aantoonen. Daarentegen gaf eene primaire enting van het hoornvlies, al naar de dosis van het entmateriaal en de grootte van de entplaats, eene plaatselijke of algemeene immuniteit van de corneae, zonder dat daarbij de huid geïmmuniseerd werd.

De onderzoekingen van Süpfle en Eisner (8) trachten voor deze afwijkende meening eene oorzaak te vinden. Zij zagen nl. dat het door herhaalde injecties van groote doses

vaccine (zooals door GRÜTER toegepast) inderdaad gelukte om naast eene huidimmuniteit, eene partieele cornea-immuniteit te doen optreden; terwijl na de gewone huidenting of na eene injectie van kleine hoeveelheden vaccinelymphe wèl huidimmuniteit optrad, doch de cornea in hare ontvankelijkheid voor eene nieuwe infectie totaal onveranderd bleef.

Ik geloof, dat deze verklaring van SÜPFLE en EISNER zeer wel te accepteeren is en dat dus, bij het gewone immuniseeren van het konijn, de cornea aan de algemeene immuniteit geen deel neemt, zooals de latere onderzoekingen van VON PROWAZEK (9) ook nader hebben aangetoond.

Ook bij gevaccineerde menschen zijn vaccine-infecties van het oog bekend, zooals blijkt uit de, in de dissertaties van GELHAUSEN (10) en DÖHLER (11), medegedeelde gevallen.

Ik wil, op eene mogelijke verklaring van dit feit en ook op de eigenaardige positie die het oog, in verband met zijne bijzondere anatomische en voedingsphysiologische verhoudingen, ook bij andere infecties inneemt (12), niet nader ingaan.

Alleen zou ik erop willen wijzen, dat dus de cornea ons een voorbeeld schijnt te geven eener zuiver plaatselijke immuniteit, die zonder medewerking van het bloedserum, alleen door celwerking verkregen wordt.

De mogelijkheid eener dergelijke lokale immuniteit wordt ook bij andere infecties naar voren gebracht.

WASSERMANN en CITRON (13) o. a. meenen dat b. v. na het doorstaan eener typhus-injectie, het darmslijmvlies eene dergelijke verandering in zijne biologische verhouding tot de typhusbacil ondergaat, dat dezelfde bacillen, die tevoren

het slijmvlies binnendrongen en aldus het typhusproces veroorzaakten, nu jarenlang in de darm kunnen woekeren, zonder dat de patient er ziek van wordt. Dit zou te verklaren zijn door lokale immunisatorische reacties der cellen van het darmslijmvlies.

Wassermann (14) heeft op grond van deze opvatting eene speciale therapeutische richting ingeslagen. Uitgaande van de overweging dat eene dergelijke lokale immuniteit alleen dan kan worden opgewekt. wanneer het weefsel dat moet geïmmuniseerd worden. plaatselijk in onmiddellijk contact wordt gebracht met de immuniseerende substantie, heeft hij uit waterige bacterie-extracten, met behulp eener ingewikkelde techniek, lang werkzaam blijvende praeparaten (in den vorm van zalven, pleisters, inwrijfmiddelen, enz.) bereid.

Deze middelen zouden, lokaal aangewend, zoowel op het zieke huid- en slijmvliesgedeelte als ook op de omgeving daarvan werken, die volslagen immuun zou worden. Vandaar dat niet alleen eene genezing der zieke plek optreedt, maar dat ook verhinderd wordt, dat het ziekteproces zich verder in de omgeving uitbreidt. Bij huidaandoeningen door staphylococcen en schimmels veroorzaakt, en bij eczemen, furunculose en dgl. zag Wassermann een goed resultaat van deze wijze van behandeling.

Ook Lippmann (15) kon eene lokale immuniteit van den darm tegen een bacterieel gif verkrijgen, zonder dat er eene algemeene immuniteit optrad Het gelukte hem muizen, door voedering met stijgende doses botulismustoxine langzamerhand onontvankelijk te maken tegenover eene meer dan tienvoudige doodelijke dosis, per os toegediend. Deze muizen gingen echter bij subkutane injectie van de mini-

male letale dosis evenzoo ten gronde als de niet voorbehandelde dieren.

Of bij voedering met bacteriën eene dergelijke zuivere weefselimmuniteit te verkrijgen is, blijft de vraag.

BRÜCKNER (16) beantwoordt deze ontkennend. Hij voederde 16 witte muizen 9 dagen lang met paratyphus-B. bacillen bij hun brood. Slechts ééne bezweek hieraan. Werden deze muizen nu met eene minimale doodelijke dosis ingespoten, die de contrôlemuizen doodde, dan bleek dat de voorbehandelde muizen allen in het leven bleven. Het bleek dus mogelijk de dieren door immuniseering per os onontvankelijk te maken voor eene subkutane toediening van het infectieuze agens.

Bij de *tuberculose* kent speciaal MUCH (17 en 18) eene groote beteekenis aan de lokale immuniteit toe. MUCH meent, dat de, bij de tuberculose, in het bloed aan te toonen beschuttingskrachten, niet de eenigen zijn waarover het lichaam beschikt; maar dat daarnaast nog eene celimmuniteit van vaste cellen moet worden aangenomen. De celimmuniteit zou bestendig, de bloedimmuniteit zou veranderlijk zijn. Deze celimmuniteit zou zich het beste laten vaststellen door intrakutane enting; met name door intrakutane enting met een der onderdeelen waaruit de tuberculine, volgens DEYCKE en MUCH (19), zou zijn samengesteld.

Nu doet zich de *vraag* voor: „Bestaat bij de *vaccine* ook eene dergelijke lokale immuniteit van de huid?"

Men zou zich kunnen voorstellen, dat, wanneer een voorbehandeld konijn opnieuw met vaccine geïnfecteerd werd,

het virus, voor zoover nog noodig, onmiddellijk naar de huid werd gevoerd en daar ter plaatse werd onschadelijk gemaakt. Maar ook bestaat de mogelijkheid, dat het virus, de huid, als uiting van de allergie, vindt in eenen toestand van bereid zijn, m. a. w. dat de huid door de prikkel van het nieuwe antigeen dadelijk antistoffen gaat produceeren en deze aan de circulatie, dus aan het organisme, afgeeft.

Door het optreden eener vroegreactie weet men dat ook het konijnenorganisme snel op eene herenting reageert, en ik zou de *vraag* dus ook aldus kunnen stellen: „Is de vroegreactie, zooals wij die bij konijnen na eene herenting zien optreden, op te vatten als eene plaatselijke of als eene algemeene reactie?"

Al kan een onderzoek, ingesteld volgens de methode der complementbinding, op deze vraag ook geen beslist antwoord brengen, toch kan een dergelijk onderzoek, dunkt mij, ook hier, eene vingerwijzing geven.

Ik meen te hebben aangetoond dat de, bij konijnen ingebrachte vaccine, eenigen tijd in het organisme blijft circuleeren en dat, van af den 6^{en} tot 7^{en} dag na eene dergelijke enting, complementbindende antistoffen in het serum verschijnen.

Het was dus interessant om na te gaan of deze antistoffen, die na eenigen tijd uit het serum verdwijnen, bij eene herenting daarin weder verschijnen; en speciaal of, als uiting van den allergischen toestand waarin het organisme door de eerste enting gebracht is, de tijd van het weder verschijnen verschilt van dien, waarop de antistoffen na eene eerste enting in de circulatie zijn aan te toonen.

Ik heb, om dit te onderzoeken, 7 met vaccine voorbe-

handelde konijnen herent; 5 door middel eener intraveneuze injeetie, en bovendien 2 door eene kutane herenting.

Met opzet koos ik allereerst de intraveneuze injeetie. Om dit duidelijk te maken zou ik mij het volgende beeld ter vergelijking willen veroorloven. Wanneer men wil nagaan de waakzaamheid der in eene vesting gelegerde troepen, en wil zien of een aanvallende vijand door de troepen in de vesting wordt afgewacht om daar ter plaatse te worden afgemaakt, dan wel of op het eerste alarm, de vesting troepen uitzendt, den vijand tegemoet, om ook buiten de vesting slag te leveren, zal men moeten beginnen met den vijand tegen de vesting te doen oprukken.

Vandaar, dat ook ik den vijand (de vaeeine) tegen de vesting (de huid) deed oprukken en dus intraveneus de vaeeine inbraeht.

Toeh heb ik gemeend ook nog 2 konijnen kutaan te moeten enten, daar de mogelijkheid bestond, dat de vaeeine in de eireulatie kwam (zooals dat bij de huidenting van een niet voorbehandeld konijn geschiedt) en dus ook buiten de huid, in het organisme, moest worden bestreden.

Als contrôle heb ik een voorbehandeld konijn den rug gesehoren en gescarificeerd en daarna een kwartier gewreven zonder vaecine, om te zien of eene dergelijke behandeling op ziehzelf niet in staat is eene verandering teweeg te brengen zoodat er weer eomplementbindende antistoffen in het serum versehijnen.

Van de 5 intraveneus herente konijnen verdroegen 3 de herinjeetie zonder eenig versehijnsel.

Een konijn (123) reageerde niet dadelijk op de inspuiting; van eenen anaphylaetisehen shoek was zelfs geene aanduiding waar te nemen. Den volgenden morgen echter was

het dier ziek en twee dagen later stierf het. Bij de sectie werden slechts enkele bronchopneumonische haardjes gevonden; verder nergens duidelijke afwijkingen. In hoeverre deze dood op rekening van de herinjectie is te brengen is niet duidelijk.

Konijn 26, dat ook geen enkel anaphylactisch verschijnsel bij de inspuiting vertoonde, at den dag na de inspuiting minder goed, maar herstelde zich binnen enkele dagen.

De beide kutaan geënte konijnen vertoonden eene vroegreactie; bij beiden was deze na 24 uur zeer duidelijk, na 2 dagen was bij het eene geen reactie meer te zien, terwijl bij het andere de reactie van de huid den 6^{en} dag verdwenen was.

Het, ter controle geënte konijn vertoonde niets bijzonders op de huid.

Het resultaat der onderzoekingen blijkt uit de volgende Tabel.

TABEL VI.

Konijn	Voorgeschiedenis.	Herenting.	Tijd van de proef.	Onderzoek van het serum op	
				Antigeen.	Antilich.
122.	Kutaan geënt. Na 5 dg. mooie eruptie, die na 17 dg. genezen is. 30 dg. na de eerste enting kutaan herent. Herenting verloopt onder het beeld eener vroegreactie.	73 dg. na de eerste enting; 43 dg. na de herenting. $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$. intraveneus.	voor de herinj. 16 u. na de „ 24 „ „ „ „	— zw. + —	— + +

Konijn	Voorgeschiedenis.	Herenting.	Tijd van de proef.	Onderzoek van het serum op	
				Anti-geen.	Anti-lich.
123.	als 122.	77 dg. na de eerste enting; 47 dg. na de herenting. $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$. intraveneus.	voor de herinj. 8 u. na de „ 24 „ „ „ „ 32 „ „ „ „	— zw. + — —	— — + +
XXVI.	Intraveneus geënt met $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$	24 dg. na de intraveneuze injectie $2^1/_2$ c. c. vacc. $^1/_{10}$. intraveneus.	voor de herinj. 16 u. na de „ 24 „ „ „ „ 48 „ „ „ „	— zw + — —	— + + +
XXXI.	Intraveneus geënt met $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$.	22 dg. na de intraveneuze injectie $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$ intraveneus.	voor de herinj. 8 u. na de „ 16 „ „ „ „ 24 „ „ „ „	— + — —	— — — +
XXX.	als XXXI.	25 dg na de intraveneuze injectie $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$. intraveneus.	voor de herinj. 8 u. na de „ 12 „ „ „ „ 16 „ „ „ „ 24 „ „ „ „	— + zw. + zw. + —	— — — + +
XXV.	Kutaan geënt. Vertoonde den 5den dag eene mooie eruptie, die na 24 dagen genezen was.	32 dg. na de huidenting rug opnieuw geschoren, gescarificeerd en met vaccine behandeld.	voor d. herent. 8 u. na de „ 24 „ „ „ „ 36 „ „ „ „	— — zw. + +	- — + +

Konijn	Voorgeschiedenis.	Herenting.	Tijd van de proef.	Onderzoek van het serum op Antigeen.	Onderzoek van het serum op Antilich.
XXII.	Kutaan geënt. Vertoonde den 5den dag eene matig-mooie eruptie, die na 18 dg. genezen was.	40 dg. na de huidenting rug opnieuw geschoren, gescarificeerd en met vaccine behandeld.	voor d. herent.	—	—
			16 u. na de „	+	—
			24 „ „ „ „	+	+
			48 „ „ „ „	—	+
XXXV.	Intraveneus $2^1/_2$ c. c. vaccine $^1/_{10}$.	24 dg. na de intraveneuze inj. huid geschoren en gescarificeerd.	voor de beh.	—	—
			8 u na de „	—	—
			16 „ „ „ „	—	—
			24 „ „ „ „	—	—
			48 „ „ „ „	—	—

Conclusie. Uit deze tabel vallen dadelijk de twee volgende feiten af te lezen.

Ten eerste zijn de complementbindende antistoffen regelmatig *binnen 24 uur* weder in het serum aan te toonen; terwijl deze, voor de herenting, daar niet in aanwezig zijn.

Ten tweede circuleert ook bij eene herenting het antigeen eenigen tijd in het organisme, maar *verdwijnt daaruit veel eerder* dan bij eene eerste enting.

Bij het contrôlekonijn trad geenerlei reactie op.

Nu zou het optreden van de antistoffen in het serum kunnen worden opgevat als een overdaad; men zou zich kunnen denken dat tòch het onschadelijk maken van de vaccine plaatselijk in de huid geschiedde en dat, als gevolg van een dergelijk proces, de overtollige antistoffen aan het serum werden afgegeven.

Maar direct tegen deze opvatting pleit het feit, dat wel

degelijk het antigeen in de circulatie eenigen tijd blijft aan aan te toonen; en juist het feit, dat het er bij een voorbehandeld konijn eerder uit verdwijnt dan bij een niet voorbehandeld, pleit mijns inziens zeer sterk voor de mogelijkheid dat ook in de circulatie, en daardoor in het geheele organisme, het antigeen wordt aangetast en vernietigd.

In dezelfde richting wijst het feit, dat ook bij de kutaan herente konijnen het antigeen in de circulatie komt en dus niet door de huid wordt tegengehouden.

Verwijzend naar hetgeen ik aan het einde van Hoofdstuk IV heb gezegd over de verhouding tusschen immuniteit en complementbindende antistoffen zou ik op grond mijner onderzoekingen willen komen tot de volgende gevolgtrekking.

Het optreden van complementbindende antistoffen in het serum van met vaccine voorbehandelde konijnen, binnen 24 uur na eene herenting met vaccine, op een tijdstip dat er ook nog antigeen in de circulatie is aan te toonen, wijst er op, dat de vroegreactie zich ook in het serum afspeelt en dat het proces der allergische reactie niet uitsluitend in de huid verloopt. **Eindconclusie.**

Dit feit, in verband met het feit, dat de complementbindende antistoffen ontstaan in de huid, maakt het aannemelijk dat de vaccine-immuniteit moet worden opgevat als eene **histogene, algemeene immuniteit.**

LITERATUUR.

1. Paschen. Ueber den Erreger der Variola-Vaccine. Immunitätsverhältnisse bei Variolavaccine. Handb. v. Kraus und Levaditi. Erster Ergänzungsband. 1911.

2. Von Prowazek. Untersuchungen über den Erreger der Vaccine. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 23. 1906.

3. Jürgens. Die diagnostische Bedeutung der Variolakörperchen. Berl. klin. Wochenschrift. 1905.

4. Kraus und Volk. Weitere Studien über Immunität bei Syphilis und bei der Vaccination gegen Variola. Wiener klin. Wochenschrift n⁰. 21. 1906.

5. Süpfle. Die Vaccine-immunität. Archiv f. Hyg. u. Inf. Krankh. Bd. 68. 1908.

6. Bélin. Des réactions vaccinales de la cornée. Revue internat. de la Vacc. Tome 1. 1910—1911.

7. Grüter. Kritische und experimentelle Studien über die Vaccineimmunität des Auges und ihre Beziehungen zum Gesamtorganismus. Archiv für Augenheilkunde. Bd. 70. 1911.

8. Süpfle und Eisner. Zur Frage der Beteiligung der Kaninchencornea an der allgemeinen Vaccine-immunität. Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. 60. 1911.

9. von Prowazek. Weitere Untersuchungen über das Vaccinevirus. Centr. Blatt f. Bakt. etc Bd. 72. 1914.

10. Gelhausen. Ueber Vaccine-Erkrankungen des Auges. Diss. Leipzig. 1904.

11. Döhler. Ueber Vaccineinfektion des Auges. Diss. Breslau 1906.

12. Miyashita. Die Immunitätsverhältnisse der Hornhaut. Zeitschr. f. Immunitätsforschung etc. Bd. 9. 1911.

13. Wassermann und Citron. Die lokale Immunität der Gewebe und ihre praktische Wichtigkeit. Deutsche medizin. Wochenschr. n⁰. 15. 1905.

14. Wassermann. Patentschrift. Verfahren zur Herstellung von zur lokalen Immunisierung und Heilung erkrankter Gewebsteile dienende Stoffen. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 1910. Ref.

15. Lippmann. Ueber lokale Immunisierung der Eingangspforten von Infektionen. Medizinische Klinik. n^{0}. 38. 1910.

16. Brückner. Ueber orale Immunisierungsversuche. Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Bd. 8. 1911.

17. Much. Die Immunitätswissenschaft. 1914.

18. —— Ueber Partialantigene. Deutsche mediz. Wochenschr. n^{0}. 11. 1914.

19. Deycke und Much. Einiges über Tuberkulin und Tuberkuloseimmunität. Münchn. med. Wochenschr. nos. 3 und 4. 1913.



Steele

